

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-532114

(P2007-532114A)

(43) 公表日 平成19年11月15日(2007. 11. 15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 5 0
C 1 2 N 9/56 (2006. 01)	C 1 2 N 9/56	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/01 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 X	4 B O 6 5
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 F	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 104 頁) 最終頁に続く		

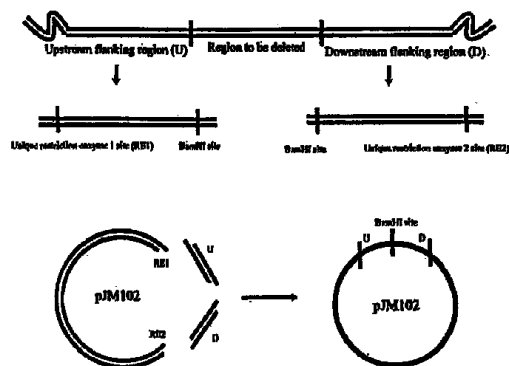
(21) 出願番号	特願2007-507507 (P2007-507507)	(71) 出願人	500284580
(86) (22) 出願日	平成17年4月7日 (2005. 4. 7)		ジェネンコー・インターナショナル・イン
(85) 翻訳文提出日	平成18年12月11日 (2006. 12. 11)		ク
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/011821		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロ
(87) 国際公開番号	W02006/033668		・アルト、ページ・ミル・ロード 925
(87) 国際公開日	平成18年3月30日 (2006. 3. 30)	(74) 代理人	100071010
(31) 優先権主張番号	60/561, 110		弁理士 山崎 行造
(32) 優先日	平成16年4月9日 (2004. 4. 9)	(74) 代理人	100121762
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 杉山 直人
		(74) 代理人	100126767
			弁理士 白銀 博
		(74) 代理人	100118647
			弁理士 赤松 利昭
		(74) 代理人	100138519
			弁理士 奥谷 雅子
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 バチルスにおける p c k A 修飾および増強されたタンパク質発現

(57) 【要約】

本発明は、p c k A 遺伝子が修飾または欠失されている、発現タンパク質を生産する改変された能力を有するように遺伝的に操作された細胞を提供する。特に本発明は、1つ以上の染色体遺伝子が修飾または不活性化された（例えば、p c k A）関心のあるタンパク質の増強された発現を示すバチルス種のようなグラム陽性細菌に関し、好ましくは1つ以上の染色体遺伝子（例えば、p c k A）がバチルス染色体から修飾または欠失されている。更なるいくつかの態様において、対応する野生型バチルス宿主染色体から1つ以上の常在染色体領域が修飾および／または欠失される。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

修飾 p c k A 遺伝子を含む微生物。

【請求項 2】

前記 p c k A 遺伝子が欠失していることを特徴とする請求項 1 に記載の微生物。

【請求項 3】

前記 p c k A 遺伝子が不活性化されていることを特徴とする請求項 1 に記載の微生物。

【請求項 4】

グラム陽性細菌である請求項 1 に記載の微生物。

【請求項 5】

前記グラム陽性細菌がバチルス (Bacillus) 種であることを特徴とする請求項 4 に記載の微生物。

【請求項 6】

非修飾 p c k A 遺伝子を有する微生物と比較して、少なくとも 1 つの関心のあるタンパク質の改善された発現を示すことを特徴とする請求項 5 に記載の微生物。

【請求項 7】

前記バチルス種内の少なくとも 1 つの常在染色体領域が変異バチルス株を生産するために修飾されており、ここで前記変異バチルス株が前記バチルス種と比較して前記関心のあるタンパク質をより高レベルで発現することを特徴とする請求項 6 に記載の微生物。

【請求項 8】

前記変異バチルス株が前記関心のあるタンパク質をコードするヘテロログなポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項 7 に記載の微生物。

【請求項 9】

変異バチルス株がバチルス・スブチリス (B. subtilis) であることを特徴とする請求項 7 に記載の微生物。

【請求項 10】

前記少なくとも 1 つの修飾された常在染色体領域が、プロファージ領域、抗菌領域、制御領域、多隣接単一遺伝子領域、およびオペロン領域からなる群より選択されることを特徴とする請求項 7 に記載の微生物。

【請求項 11】

前記少なくとも 1 つの修飾された常在染色体領域が、P B S X 領域、皮膚領域、プロファージ 7 領域、S P β 領域、プロファージ 1 領域、プロファージ 2 領域、プロファージ 3 領域、プロファージ 4 領域、プロファージ 5 領域、プロファージ 6 領域、P P S 領域、P K S 領域、y v f F-y v e K 領域、D H B 領域およびそれらの断片からなる群より選択されることを特徴とする請求項 10 に記載の微生物。

【請求項 12】

前記少なくとも 1 つの修飾された常在染色体領域が欠失により修飾されていることを特徴とする請求項 10 に記載の微生物。

【請求項 13】

前記欠失が 1 つ以上の常在染色体領域またはそれらの断片を含み、ここで前記常在染色体領域が約 0.5 ~ 500 キロ塩基を含むことを特徴とする請求項 12 に記載の微生物。

【請求項 14】

前記 p c k A 遺伝子の欠失を含む改変バチルス株。

【請求項 15】

少なくとも 1 つのプロテアーゼを生産することを特徴とする請求項 14 に記載の改変バチルス株。

【請求項 16】

前記プロテアーゼがスブチリシン (subtilisin) であることを特徴とする請求項 14 に記載の改変バチルス株。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

前記スブチリシンが、スブチリシン168、スブチリシンBPN'、スブチリシン・カールスバーグ、スブチリシンDY、スブチリシン147、スブチリシン309、およびそれらの変異体からなる群より選択されることを特徴とする請求項16に記載の改変バチルス株。

【請求項18】

sbo、slr、ybcO、csn、spolISA、sigB、phrC、rapA、CssS、trpA、trpB、trpC、trpD、trpE、trpF、tdh/kbl、alsD、sigD、prpC、gapB、fbp、rocA、ycgN、ycgM、rocF、およびrocDからなる群より選択された少なくとも1つの染色体遺伝子における少なくとも1つの欠失を更に含むことを特徴とする請求項14に記載の改変バチルス株。 10

【請求項19】

degU、degQ、degS、scoC4、spolIE、およびoppAからなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子における少なくとも一つの突然変異を含むことを特徴とする請求項18に記載の改変バチルス株。

【請求項20】

前記突然変異がdegU(Hy)32を含むことを特徴とする請求項20に記載の改変バチルス株。

【請求項21】

外来配列を含む少なくとも1つのDNA構築体を更に含むことを特徴とする請求項14に記載の改変バチルス株。 20

【請求項22】

前記外来配列が少なくとも1つの選択マーカーおよび前記pckA遺伝子を含むことを特徴とする請求項21に記載の改変バチルス株。

【請求項23】

前記外来配列が、sbo、slr、ybcO、csn、spolISA、sigB、phrC、rapA、CssS、trpA、trpB、trpC、trpD、trpE、trpF、tdh/kbl、alsD、sigD、prpC、gapB、fbp、rocA、ycgN、ycgM、rocF、およびrocDからなる群より選択された少なくとも一つの遺伝子を更に含むことを特徴とする請求項22に記載の改変バチルス株。 30

【請求項24】

前記少なくとも1つの選択マーカーが前記遺伝子の2つの断片間に位置していることを特徴とする請求項23に記載の改変バチルス株。

【請求項25】

前記外来配列が選択マーカーおよび少なくとも1つのホモロジー・ボックスを含み、ここで該ホモロジー・ボックスが前記選択マーカーの5'および/または3'末端に隣接することを特徴とする請求項21に記載の改変バチルス株。

【請求項26】

前記外来配列が前記改変バチルス株のゲノムに組み込まれていることを特徴とする請求項21に記載の改変バチルス株。 40

【請求項27】

配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号39、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号50、配列番号37、配列番号25、配列番号21、配列番号50、配列番号23、配列番号27、配列番号19、配列番号31、配列番号48、配列番号46、配列番号35、および配列番号33からなる群より選択される核酸配列に示される少なくとも1つの配列を含む単離核酸。

【請求項28】

配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47 50

、配列番号 49、配列番号 51、配列番号 38、配列番号 26、配列番号 22、配列番号 57、配列番号 24、配列番号 28、配列番号 20、配列番号 32、配列番号 55、配列番号 53、配列番号 36、および配列番号 34 からなる群より選択されるアミノ酸をコードする単離核酸配列。

【請求項 29】

選択マーカー、および c s s S 遺伝子、c s s S 遺伝子断片またはこれらのホモログ配列のいずれかを含む外来配列を含む精製された DNA 構築体。

【請求項 30】

前記選択マーカーが前記 c s s S 遺伝子の 2 つの断片間に位置していることを特徴とする請求項 29 に記載の DNA 構築体。

10

【請求項 31】

前記外来配列が、前記選択マーカーの 5' および / または 3' 末端に隣接する、少なくとも 1 つのホモロジー・ボックスを更に含むことを特徴とする請求項 29 に記載の DNA 構築体。

【請求項 32】

前記 DNA 配列が、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 42、配列番号 44、配列番号 46、配列番号 48、配列番号 50、配列番号 37、配列番号 25、配列番号 21、配列番号 50、配列番号 29、配列番号 23、配列番号 27、配列番号 19、配列番号 31、配列番号 48、配列番号 46、配列番号 35、および配列番号 33 からなる群より選択される少なくとも一つの核酸配列を含むことを特徴とする請求項 29 に記載の DNA 構築体。

20

【請求項 33】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 45、配列番号 47、配列番号 49、配列番号 51、配列番号 38、配列番号 26、配列番号 22、配列番号 57、配列番号 30、配列番号 24、配列番号 28、配列番号 20、配列番号 32、配列番号 55、配列番号 53、配列番号 36、および配列番号 34 からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする少なくとも一つの遺伝子を含むことを特徴とする請求項 29 に記載の DNA 構築体。

30

【請求項 34】

請求項 29 に記載の DNA 構築体で形質転換された宿主細胞。

【請求項 35】

大腸菌およびバチルス細胞からなる群より選択されることを特徴とする請求項 34 に記載の宿主細胞。

【請求項 36】

前記外来配列が前記宿主細胞における染色体に組み込まれていることを特徴とする請求項 34 に記載の宿主細胞。

【請求項 37】

微生物により少なくとも一つのタンパク質の生産を増強する方法であって、

40

a) 微生物宿主細胞を提供する工程、

b) 改変株を生産するために前記宿主細胞における p c k A 遺伝子を不活性化する工程

、および

c) 前記タンパク質の発現に適した条件下で前記改変株を成長させる工程

を含む方法。

【請求項 38】

前記改変株により発現された前記タンパク質を回収する工程を更に含むことを特徴とする請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記宿主細胞が大腸菌およびバチルス細胞からなる群より選択されることを特徴とする

50

請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

sbo、slr、ybcO、csn、spolISA、sigB、phrC、rapA、CssS、trpA、trpB、trpC、trpD、trpE、trpF、tdh/kbl、alsD、sigD、prpC、gapB、fbp、rocA、ycgN、ycgM、rocF、および rocD からなる群より選択される少なくとも一つの染色体遺伝子を不活性化する工程を更に含むことを特徴とする請求項 37 に記載の方法。

【請求項 41】

前記タンパク質がホモログタンパク質およびヘテログタンパク質からなる群より選択されることを特徴とする請求項 37 に記載の方法。

10

【請求項 42】

前記少なくとも一つの染色体遺伝子が挿入不活性化により不活性化されていることを特徴とする請求項 37 に記載の方法。

【請求項 43】

前記少なくとも一つのタンパク質が、プロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、抗体、ホルモン、および成長因子からなる群より選択されることを特徴とする請求項 37 に記載の方法。

【請求項 44】

関心のあるタンパク質を発現する改変バチルス株を得るための方法であって、pckA 遺伝子を含む外来遺伝子を含む DNA 構築体でバチルス宿主細胞を形質転換する工程含み、ここで前記外来配列が改変バチルス株を生産するために前記バチルス宿主細胞の染色体に組み込まれ、更に一つ以上の染色体遺伝子が不活性化されており、および少なくとも一つの関心のあるタンパク質の発現に好適な成長条件下で前記改変バチルス株を成長させる工程を含むことを特徴とする方法。

20

【請求項 45】

前記少なくとも一つの関心のあるタンパク質が、プロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、抗体、ホルモン、および成長因子からなる群より選択されることを特徴とする請求項 44 に記載の方法。

30

【請求項 46】

前記バチルス宿主細胞が、バチルス・リケニフォルミス (B. licheniformis)、バチルス・レントゥス (B. lentus)、バチルス・スブチルス (B. subtilis)、バチルス・アミロリケファシエンス (B. amyloliquefaciens)、バチルス・ブレビス (B. brevis)、バチルス・ステアロテルモフィルス (B. stearothermophilus)、バチルス・アルカロフィルス (B. alkalophilus)、バチルス・コアグランス (B. coagulans)、バチルス・サーキュランス (B. circulans)、バチルス・プミルス (B. pumilus)、バチルス・チューリングイエンス (B. thuringiensis)、バチルス・クラウシ (B. clausii)、バチルス・メガテリウム (B. megaterium) およびバチルス・スブチリスからなる群より選択されることを特徴とする請求項 44 に記載の方法。

40

【請求項 47】

前記バチルス宿主細胞が組換え宿主細胞であることを特徴とする請求項 44 に記載の方法。

【請求項 48】

前記改変バチルス株により生産される前記関心のあるタンパク質が回収されることを特徴とする請求項 44 に記載の方法。

【請求項 49】

前記 DNA 構築体が更に選択マーカーを含むことを特徴とする請求項 44 に記載の方法

50

。

【請求項 50】

前記選択マーカーが、前記バチルス宿主細胞の前記染色体へ前記外来配列を組み込んだ上で前記外来配列から切り出されることを特徴とする請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

前記外来配列が、sbo、slr、ybcO、csn、spolISA、sigB、phrC、rapA、CssS、trpA、trpB、trpC、trpD、trpE、trpF、tdh/kbl、alsD、sigD、prpC、gapB、fbp、rocA、ycgN、ycgM、rocF、およびrocDからなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子を更に含み、ここで前記DNA構築体がバチルス宿主細胞の染色体に組み込まれ、前記バチルス宿主細胞の前記染色体上に存在する1つ以上の遺伝子の欠失をもたらすことを特徴とする請求項 44 に記載の方法。 10

【請求項 52】

前記DNA構築体が、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号39、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号50、配列番号37、配列番号25、配列番号21、配列番号50、配列番号29、配列番号23、配列番号27、配列番号19、配列番号31、配列番号48、配列番号46、配列番号35、および配列番号33からなる群より選択される少なくとも一つの核酸配列を含むことを特徴とする請求項 44 に記載の方法。 20

【請求項 53】

前記DNA構築体が、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47、配列番号49、配列番号51、配列番号38、配列番号26、配列番号22、配列番号57、配列番号30、配列番号24、配列番号28、配列番号20、配列番号32、配列番号55、配列番号53、配列番号36、および配列番号34からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする少なくとも1つの遺伝子を含むことを特徴とする請求項 44 に記載の方法。

【請求項 54】

増強されたプロテアーゼ生産を有するバチルス・スブチリス株を得るための方法であって、DNA構築体によりバチルス・スブチリス宿主細胞を形質転換する工程、改変バチルス・スブチリス株を生産するために、DNA構築体と、バチルス・スブチリス染色体からpcK Aが欠失したバチルス・スブチリス染色体の相同領域との相同組換えを可能にする工程、および前記プロテアーゼの発現に好適な条件下で改変バチルス・スブチリス株を成長させる工程を含むことを特徴とする方法。 30

【請求項 55】

sbo、slr、ybcO、csn、spolISA、sigB、phrC、rapA、CcssS、trpA、trpB、trpC、trpD、trpE、trpF、tdh/kbl、alsD、sigD、prpC、gapB、fbp、rocA、ycgN、ycgM、rocF、およびrocDからなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子が前記バチルス・スブチリスの染色体から欠失していることを特徴とする請求項 54 に記載の方法。 40

【請求項 56】

前記プロテアーゼが、ホモログプロテアーゼおよびヘテログプロテアーゼからなる群より選択されることを特徴とする請求項 54 に記載の方法。

【請求項 57】

前記プロテアーゼがスブチリシンであることを特徴とする請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

前記スブチリシンが、スブチリシン168、スブチリシンBPN'、スブチリシン・カールスバーグ、スブチリシンDY、スブチリシン147、スブチリシン309、およびそ 50

これらの変異体からなる群より選択されることを特徴とする請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

前記改変バチルス・スプチリス株が、degU、degQ、degS、scoc4、spol1E、およびoppA からなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子における一つの突然変異を更に含むことを特徴とする請求項 54 に記載の方法。

【請求項 60】

前記突然変異が degU (Hy) 32 を含むことを特徴とする請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

前記改変バチルス・スプチリス株が、1 つ以上の常在染色体領域またはそれらの断片の欠失を含み、ここで前記常在染色体領域が約 0.5 ～ 500 キロ塩基を含むことを特徴とする請求項 54 に記載の方法。 10

【請求項 62】

前記 DNA 構築体が、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 42、配列番号 44、配列番号 46、配列番号 48、配列番号 50、配列番号 37、配列番号 25、配列番号 21、配列番号 50、配列番号 29、配列番号 23、配列番号 27、配列番号 19、配列番号 31、配列番号 48、配列番号 46、配列番号 35、および配列番号 33 からなる群より選択される少なくとも一つの核酸配列を含むことを特徴とする請求項 54 に記載の方法。 20

【請求項 63】

前記 DNA 構築体が、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 45、配列番号 47、配列番号 49、配列番号 51、配列番号 38、配列番号 26、配列番号 22、配列番号 57、配列番号 30、配列番号 24、配列番号 28、配列番号 20、配列番号 32、配列番号 55、配列番号 53、配列番号 36、および配列番号 34 からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする少なくとも 1 つの遺伝子を含むことを特徴とする請求項 54 に記載の方法。

【請求項 64】

バチルスにおける関心のあるタンパク質の発現を増強するための方法であって、選択マーカーを含む DNA 構築体および不活性化する染色体セグメントをバチルス宿主細胞に導入する工程、ここで改変バチルス株を生産するために、前記 DNA 構築体はバチルス宿主株の染色体に組み込まれ、前記バチルス宿主株からの常在染色体領域またはその断片の欠失を生じ、および前記バチルス宿主株における関心のあるタンパク質の発現に比較して前記改変バチルス株における関心のあるタンパク質の発現が大きくなるのに好適な条件下で前記改変バチルス株を成長させる工程を含む方法。 30

【請求項 65】

前記関心のあるタンパク質を回収する工程を更に含むことを特徴とする請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

前記改変バチルス株から前記選択マーカーを切り出す工程を更に含むことを特徴とする請求項 64 に記載の方法。 40

【請求項 67】

前記常在染色体領域が、PBsX、皮膚、プロファージ 7、SPβ、プロファージ 1、プロファージ 2、プロファージ 3、プロファージ 4、プロファージ 5、プロファージ 6、PPS、PKS、yvfF-yvE K、DHB およびそれらの断片からなる群より選択されることを特徴とする請求項 64 に記載の方法。

【請求項 68】

前記改変バチルス株が少なくとも 2 つの常在染色体領域の欠失を含むことを特徴とする請求項 64 に記載の方法。 50

【請求項 6 9】

前記関心のあるタンパク質がホモログタンパク質およびヘテログタンパク質からなる群より選択されることを特徴とする請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記関心のあるタンパク質が、プロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、抗体、ホルモン、および成長因子からなる群より選択されることを特徴とする請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記バチルス宿主株が、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・レントゥス、バチルス・スプチルス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・ブレビス、バチルス・ステアロテルモフィルス、バチルス・クラウシ、バチルス・アルカロフィルス、バチルス・コアグランス、バチルス・サーキュランス、バチルス・プミルス、およびバチルス・チューリングエンシスからなる群より選択されることを特徴とする請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記改変バチルス・スプチリス株が、deg U、deg Q、deg S、sco C 4、spol l E、およびopp A からなる群より選択される 1 つの遺伝子における少なくとも一つの突然変異を更に含むことを特徴とする請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記突然変異がdeg U (Hy) 3 2 を含むことを特徴とする請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

バチルスにおける関心のあるタンパク質の発現を増強するための方法であって、少なくとも 1 つのバチルス細胞から核酸を得る工程、少なくとも 1 つの関心のある遺伝子を同定するために前記バチルス細胞からの核酸についてトランスクリプトームDNAアレイ分析を行う工程、DNA構築体を生産するために前記少なくとも 1 つの関心のある遺伝子を修飾する工程、および改変バチルス株を生産するためにバチルス宿主細胞に前記DNA構築体を導入し、ここで改変されていないバチルスにおける関心のあるタンパク質の発現に比較して前記関心のあるタンパク質の発現が増強されるような条件下で、前記改変バチルス株が関心のあるタンパク質を生産することができることを特徴とする工程を含む方法。

【請求項 7 5】

前記関心のあるタンパク質が、アミノ酸生合成経路および生分解経路からなる群より選択される少なくとも 1 つの生化学経路に関係していることを特徴とする請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

少なくとも 1 つの生分解経路が働かない (disable) ことを特徴とする請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記生分解経路が関心のある遺伝子の転写のために働かないことを特徴とする請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記バチルス宿主細胞が、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・レントゥス、バチルス・スプチルス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・ブレビス、バチルス・ステアロテルモフィルス、バチルス・クラウシ、バチルス・アルカロフィルス、バチルス・コアグランス、バチルス・サーキュランス、バチルス・プミルス、およびバチルス・チューリングエンシスからなる群より選択されることを特徴とする請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記関心のあるタンパク質がホモログタンパク質およびヘテログタンパク質からなる

群より選択されることを特徴とする請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記関心のあるタンパク質が、プロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、抗体、ホルモン、および成長因子からなる群より選択されることを特徴とする請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

バチルスにおける関心のあるタンパク質の発現を増強するための方法であって、少なくとも 1 つのバチルス細胞から少なくとも 1 つの関心のある遺伝子を含む核酸を得る工程、前記関心のある遺伝子を含む増幅断片プールを生産するために前記断片を増幅する工程、DNA 構築体を生産するために前記増幅断片を結合する工程、改変バチルス株を生産するためにバチルス宿主細胞に前記 DNA 構築体を直接的に形質移入し、ここで前記改変バチルス株が p r p C、s i g D、および t d h / k b l からなる群より選択される修飾遺伝子を含むことを特徴とする工程、改変されていないバチルスにおける前記関心のあるタンパク質の発現に比較して前記関心のあるタンパク質の発現が増強されるような条件下で、前記改変バチルス株を培養する工程を含む方法。

【請求項 8 2】

前記バチルス宿主細胞が、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・レントゥス、バチルス・スプチルス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・ブレビス、バチルス・ステアロテルモフィルス、バチルス・クラウシ、バチルス・アルカロフィルス、バチルス・コアグランス、バチルス・サーキュランス、バチルス・プミルス、およびバチルス・チューリングエンシスからなる群より選択されることを特徴とする請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記関心のあるタンパク質がホモログタンパク質およびヘテログタンパク質からなる群より選択されることを特徴とする請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記関心のあるタンパク質が、プロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、抗体、ホルモン、および成長因子からなる群より選択されることを特徴とする請求項 8 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、p c k A 遺伝子が修飾または除去された発現タンパク質を生産するために改変された能力を有するように遺伝子操作されている細胞を提供する。特に本発明は、1 つ以上の染色体遺伝子が修飾および／または不活性化された（例えば、p c k A）、および好ましくは 1 つ以上の染色体遺伝子（例えば、p c k A）が修飾および／またはバチルス染色体から除去された関心のあるタンパク質の増強された発現を示すバチルス種のようなグラム陽性菌に関する。いくつかの更なる態様において、1 つ以上の常在染色体領域は修飾および／または対応する野生型バチルス宿主染色体から除去されている。

【背景技術】

【0 0 0 2】

遺伝子工学は、産業バイオリアクター、細胞工場として、および食品発酵において用いられる微生物の改良を可能にしてきた。特にバチルス種は多数の有用なタンパク質および代謝産物を生産および分泌する（ズコウスキー、「商業的価値を有する生産物の生産」、ドイおよび M c G l o u g l i n 編『バチルスの生物学—産業への応用』、バターワース・ハイネマン社刊、ストーンハム、マサチューセッツ州、3 1 1 頁—3 3 7 頁 [1 9 9 2 年] ）。産業に用いられる最も一般的なバチルス種は、バチルス・リケニフォルミス（B . l i c h e n i f o r m i s ）、バチルス・アミロリケファシエンス（a m y l o l i

10

20

30

40

50

quefaciens) およびバチルス・スブチルス (B. subtilis) である。それらのGRAS (一般的に認識された安全性) の地位のために、これらバチルス種の菌株は食品および製薬産業において用いられるタンパク質生産用の天然の候補者である。重要な生成酵素には、 α -アミラーゼ、中性プロテアーゼ、およびアルカリ (またはセリン) プロテアーゼが含まれる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

しかしながら、バチルス宿主細胞におけるタンパク質生産の理解が進化したとはいえ、これらタンパク質の発現を増大するための方法の必要性が依然として残されている。

10

【課題を解決するための手段】

【0004】

発明の要約

本発明は p c k A 遺伝子が修飾または除去された発現タンパク質を生産するため改変された能力を有するように遺伝子操作された細胞を提供する。特に本発明は、1つ以上の染色体遺伝子が修飾および／または不活性化された (例えば、p c k A)、および好ましくは1つ以上の染色体遺伝子 (例えば、p c k A) が修飾および／またはバチルス染色体から除去された関心のあるタンパク質の増強された発現を示すバチルス種のようなグラム陽性菌に関する。いくつかの更なる態様において、1つ以上の常在染色体領域は修飾および／または対応する野生型バチルス宿主染色体から除去されている。いくつかの好ましい態様において本発明は、バチルスにおける少なくとも一つの関心のあるタンパク質の改善された発現および／または分泌のための方法および組成物を提供する。

20

【0005】

特に好ましい態様において、本発明はバチルスにおける少なくとも1つの関心のあるタンパク質の改善された発現および／または分泌のための手段を提供する。これらの態様においてより特別に、本発明は、修飾および／または不活性化された遺伝子が菌株生存のために必要でないバチルス宿主株における1つ以上の染色体遺伝子の修飾および／または不活性化に関する。1つ以上の染色体遺伝子の修飾および／または不活性化の一つの結果は、対応する非改変バチルス宿主株よりも高レベルの関心のあるタンパク質を発現することが可能な改変バチルス株が生産されることである。

30

【0006】

さらに別の態様において本発明は、欠失常在染色体領域が菌株生存のために必要でないバチルス宿主株における染色体DNAの広範な領域を除去するための手段を提供する。1つ以上の常在染色体領域の除去の一つの結果は、対応する非改変バチルス株よりも高レベルの関心のあるタンパク質を発現することが可能な改変バチルス菌株が生産されることである。いくつかの好ましい態様においてバチルス宿主株は、関心のあるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む組換え宿主株である。いくつかの特に好ましい態様において、改変バチルス菌株は、バチルス・スブチルス菌株である。以下に詳述するように、欠失常在染色体領域は、プロフェージ領域、抗微生物 (例えば、抗菌) 領域、調節領域、多隣接単一遺伝子領域およびオペロン領域を含むが、これらに限定されない。

40

【0007】

いくつかの態様において、本発明はバチルス種細胞からの関心のあるタンパク質の発現を増強するための方法と組成物を提供する。いくつかの好ましい態様において、この方法は、改変バチルス菌株を生産するためにバチルス宿主株における p c k A 遺伝子を不活性化する工程、適切な培養条件の下で改変バチルス菌株を増殖する工程、および対応する非改変バチルス宿主株と比べてタンパク質の発現が増強される改変バチルスにおいて関心のあるタンパク質が発現可能な工程を含む。他の態様において、s b o、s l r、y b c O、c s n、s p o l l S A、s i g B、p h r C、r a p A、C s s S、t r p A、t r p B、t r p C、t r p D、t r p E、t r p F、t d h / k b l、a l s D、s i g D、p r p C、g a p B、f b p、r o c A、y c g N、y c g M、r o c F、および r o

50

c Dからなる群から選択される1つ以上の追加的な染色体遺伝子は、改変バチルス菌株を産生するためにバチルス宿主株において不活性化され、適切な培養条件の下で改変バチルス菌株を増殖し、および対応する未改変バチルス宿主株に比べてタンパク質の発現が増強される改変バチルス菌において少なくとも一つの関心のあるタンパク質の発現を可能とする。いくつかの態様において、関心のあるタンパク質は相同 (homologous) タンパクであり、一方で他の態様において関心のあるタンパク質は異種 (heterologous) タンパクである。いくつかの態様において、1つ以上の関心のあるタンパク質が生産される。いくつかの好ましい態様において、バチルス種はバチルス・スブチルス菌株である。また更なる態様において、染色体遺伝子の不活性化は、改変バチルス菌株を生産するための遺伝子の欠失を含む。追加的な態様において、染色体遺伝子の不活性化は挿入不活性化を含む。いくつかの好ましい態様において、関心のあるタンパク質は酵素である。いくつかの態様において、関心のあるタンパク質はプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼおよびホスファターゼから選択され、一方で他の態様において、関心のあるタンパク質は抗体、ホルモンおよび成長因子からなる群から選択される。

【0008】

更に追加的な態様において、本発明は p c k A 遺伝子の欠失を含む改変バチルス菌株を提供する。一方、他の態様において改変バチルス菌株は更に、s b o、s l r、y b c O、c s n、s p o l l S A、s i g B、p h r C、r a p A、C s s S、t r p A、t r p B、t r p C、t r p D、t r p E、t r p F、t d h / k b l、a l s D、s i g D、p r p C、g a p B、f b p、r o c A、y c g N、y c g M、r o c F、および r o c D の群より選択された1つ以上の染色体遺伝子における欠失を含む。いくつかの態様において、改変菌株はプロテアーゼ生産バチルス菌株である。別の態様において、改変バチルス菌株はスブチリシン生産菌株である。更に他の態様において、改変バチルス菌株は、さらに d e g U、d e g Q、d e g S、s c o C 4、s p o l l E、および o p p A からなる群より選択された遺伝子における突然変異を含む。

【0009】

更なる態様において、本発明は外来配列を含むDNA構築体を提供する。いくつかの態様において外来配列には、選択マーカーおよび p c k A 遺伝子を含む遺伝子および／または遺伝子断片が含まれる。更なる態様において、外来配列はさらに s b o、s l r、y b c O、c s n、s p o l l S A、s i g B、p h r C、r a p A、C s s S、t r p A、t r p B、t r p C、t r p D、t r p E、t r p F、t d h / k b l、a l s D、s i g D、p r p C、g a p B、f b p、r o c A、y c g N、y c g M、r o c F、および r o c D からなる群から選択される遺伝子および／遺伝子断片を含む。別の態様において、選択マーカーは二つの遺伝子断片の間に位置している。他の態様において、外来配列は選択マーカーおよび該マーカーの5'および／または3'末端に隣接するホモロジーボックスを含む。追加的な態様において、宿主細胞はDNA構築体を用いて形質転換される。更なる態様において、宿主細胞は大腸菌 (大腸菌) またはバチルス細胞である。いくつかの好ましい態様において、DNA構築体は宿主細胞の染色体に組み込まれる。

【0010】

また本発明は、本発明のDNA構築体を用いて、バチルス宿主細胞を形質転換することを含む関心のあるタンパク質を発現する改変バチルス菌株を得るための方法を提供する。ここでDNA構築体はバチルス宿主細胞の染色体に組み込まれており、1つ以上の染色体遺伝子が不活性化されている改変バチルス菌株を産生し、および少なくとも一つの関心のあるタンパク質の発現のために、適切な培養条件下で改変バチルス菌株を増殖する。いくつかの態様において、関心のあるタンパク質は、プロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼおよびホスファターゼから選択され、一方で他の態様において関心のあるタンパク質は、抗体、ホルモンおよび成長因子からなる群より選択される。更に追加的な態様において、バチルス宿主菌株は、バチルス・リケニフォルミス (B. licheniformis)、バチル

ス・レントゥス (*B. lentus*)、バチルス・スブチルス (*B. subtilis*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*)、バチルス・ブレビス (*B. brevis*)、バチルス・ステアロテルモフィルス (*B. stearothermophilus*)、バチルス・アルカロフィルス (*B. alkalophilus*)、バチルス・コアグランス (*B. coagulans*)、バチルス・サーキュランス (*B. circulans*)、バチルス・プミルス (*B. pumilus*)、バチルス・チューリングイエンス (*B. thuringiensis*)、バチルス・クラウシ (*B. clausii*)、バチルス・メガテリウム (*B. megaterium*) からなる群より選択され、好ましくはバチルス・スブチルスである。いくつかの態様において、バチルス宿主菌株は組み換え宿主である。更に追加的な態様において、関心のあるタンパク質は回収される。更なる態様において、選択マーカーは改変バチルスから切り出される。

10

【0011】

更に本発明は、関心のあるタンパク質を発現する改変バチルス菌株を得る方法を提供する。いくつかの態様において前記方法は、選択マーカーおよび *pckA* を含む外来配列を含む DNA 構築体を用いてバチルス宿主を形質転換する工程を含む。更なる態様において外来配列はさらに、*sbo*、*slr*、*ybcO*、*csn*、*spolISA*、*sigB*、*phrC*、*rapA*、*CssS*、*trpA*、*trpB*、*trpC*、*trpD*、*trpE*、*trpF*、*tdh/kbl*、*alsD*、*sigD*、*prpC*、*gapB*、*fbp*、*rocA*、*ycgN*、*ycgM*、*rocF*、および *rocD* からなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子を含む。ここで DNA 構築体は、バチルス宿主細胞の染色体へ組み込まれ、1 つ以上の遺伝子の欠失をもたらし、改変バチルス菌株を獲得し、および関心のあるタンパク質の発現のために適切な培養条件下で改変バチルス菌株を増殖する。

20

【0012】

いくつかの代替的な態様において、本発明は外来配列を含む DNA 構築物を提供する。ここで外来配列には、選択マーカーおよび *cssS* 遺伝子、*cssS* 遺伝子断片またはそれらと相同配列が含まれる。いくつかの態様において、選択マーカーは、遺伝子の二つの断片の間に位置する。他の態様において、外来配列は選択マーカーおよび該マーカーの 5' および/または 3' 末端に隣接するホモロジーボックスを含む。更に他の態様において、宿主細胞は DNA 構築体を用いて形質転換される。追加的な態様において、宿主細胞は大腸菌またはバチルス細胞である。また、更なる態様において、DNA 構築体は宿主細胞の染色体に組み込まれる。

30

【0013】

また本発明は、増強されたプロテアーゼ生産を示すバチルス・スブチルス菌株を得るための方法を提供する。いくつかの態様において、前記方法は以下の工程を含んでいる。すなわち、本発明に従って DNA 構築体を用いてバチルス・スブチルス宿主細胞を形質転換する工程、DNA 構築体と *pckA* が除去されているバチルス染色体の相同領域との相同組換を可能とする工程、改変バチルス・スブチルス菌株を得る工程、およびプロテアーゼの発現のための適切な条件下で改変バチルス菌株を増殖する工程である。更なる態様において、*sbo*、*slr*、*ybcO*、*csn*、*spolISA*、*sigB*、*phrC*、*rapA*、*CssS*、*trpA*、*trpB*、*trpC*、*trpD*、*trpE*、*trpF*、*tdh/kbl*、*alsD*、*sigD*、*prpC*、*gapB*、*fbp*、*rocA*、*ycgN*、*ycgM*、*rocF* および *rocD* の遺伝子の少なくとも一つが、バチルス染色体から欠失され、改変バチルス・スブチルス菌株を獲得し、プロテアーゼの発現のための適切な条件下で改変バチルス菌株を増殖する。いくつかの態様において、プロテアーゼ生産バチルスは、スブチリシン生産菌株である。他の態様において、プロテアーゼは異種プロテアーゼである。更なる態様において、前記プロテアーゼ生産株にはさらに、*degU*、*degQ*、*degS*、*scoC4*、*spolIE*、および *oppA* からなる群より選択される遺伝子における突然変異が含まれる。いくつかの態様において、不活性化は遺伝子の挿入不活性化を含む。

40

50

【0014】

更に本発明は、一つの *pckA* の欠失を含む改変バチルス・スプチルス菌株を提供する。ここで、前記改変バチルス・スプチルス菌株は、少なくとも一つの関心のあるタンパク質の発現が可能である。更なる態様において、少なくとも一つの関心のあるタンパク質の発現が可能である改変バチルス・スプチルス菌株は、*sbo*、*slr*、*ybcO*、*csn*、*spolISA*、*sigB*、*phrC*、*rapA*、*CssS*、*trpA*、*trpB*、*trpC*、*trpD*、*trpE*、*trpF*、*tdh/kbl*、*alsD*、*sigD*、*prpC*、*gapB*、*fbp*、*rocA*、*ycgN*、*ycgM*、*rocF*および*rocD*からなる群より選択される一つ以上の染色体遺伝子の欠失を含む。いくつかの態様において、関心のあるタンパク質は酵素である。いくつかの更なる態様において、関心のあるタンパク質は異種タンパクである。 10

【0015】

いくつかの態様において本発明は、1つ以上の常在染色体領域またはその断片の欠失を含む改変バチルス菌株を提供する。ここで、前記常在染色体領域は約0.5から500キロベース(kb)を含み、および改変バチルス菌株は、基本的に同一の培養条件下で増殖する場合、対応する未改変バチルス菌株に比べて関心のあるタンパク質の増強された発現レベルを有する。いくつかの好ましい態様において、これらの改変バチルス菌株は *pckA* 遺伝子の欠失を含む。

【0016】

さらに追加的な態様において本発明は、PBSX領域、皮膚(*skin*)領域、プロファージ7領域、SP β 領域、プロファージ1領域、プロファージ2領域、プロファージ3領域、プロファージ4領域、プロファージ5領域、プロファージ6領域、PPS領域、PKS領域、*yvfF-yvK*領域、DHB領域およびそれらの断片からなる群より選択される常在染色体領域の少なくとも一つの欠失を含むプロテアーゼ生産バチルス菌株を提供する。 20

【0017】

更なる態様において、本発明はバチルスにおける少なくとも一つの関心のあるタンパク質の発現を増強するための以下の工程を含む方法を提供する。すなわち、選択マーカーおよび不活性化染色体断片を含むDNA構築体をバチルス宿主菌株に導入することによって生産された改変バチルスを得、ここでDNA構築物はバチルス染色体へ組み込まれる工程、バチルス宿主細胞からの常在染色体領域またはそれらの断片の欠失をもたらす工程、および、適切な培養条件下で改変バチルス菌株を増殖し、ここで関心のあるタンパク質の発現が未改変バチルス宿主細胞に対応している場合と比べて、関心のあるタンパク質の発現が、改変バチルス菌株においてより大きい工程を含む方法である。 30

【0018】

また本発明は、バチルス菌株から少なくとも一つの関心のあるタンパク質を得るための以下の工程を含む方法を提供する。すなわち、選択マーカーおよび不活性化染色体部分を含むDNA構築体を用いてバチルス宿主細胞を形質転換し、ここでDNA構築体はバチルス菌株の染色体に組み込まれ、改変バチルス菌株を形成するために常在染色体領域またはそれらの断片の欠失をもたらす工程、関心のあるタンパク質の発現を可能とする適切な培養条件下で改変バチルス菌株を増殖する工程、および関心のあるタンパク質を回収する工程を含む方法である。 40

【0019】

また本発明は、有益な突然変異をスクリーニングおよび／または同定するためのDNAマイクロアレイデータの利用手段を提供する。いくつかの特に好ましい態様において、これらの突然変異は *pckA* 遺伝子を含む。更なる態様において、突然変異は *trpA*、*trpB*、*trpC*、*trpD*、*trpE*、*trpF*、*tdh/kbl*、*rocA*、*ycgN*、*ycgM*、*rocF*および*rocD*からなる群より選択される遺伝子を含む。いくつかの好ましい態様において、これらの有益な突然変異は、所定のアミノ酸生合成経路および生分解経路の同時発現に関するトランスクリプトームの証拠、および／または分解経路 50

がより高い実績の菌株をもたらすという証拠、および／または生合成経路の過剰発現がより高い実績の菌株をもたらすという証拠に基づく。追加的な様態において、本発明は、有益な突然変異を提供するためのDNAマイクロアレイデータの利用手段を提供する。いくつかの好ましい態様において、これらの突然変異はpckA遺伝子を含む、他方更なる態様において、アミノ酸生合成経路が非均衡で、全経路の過剰発現が親（すなわち、野生型および／または出発）菌株よりも高い実績を提供する場合、これらの突然変異はtrpA、trpB、trpC、trpD、trpE、trpF、tdh/kbl、rocA、ycgN、ycgM、rocFおよびrocDからなる群より選択される遺伝子を含む。更に本発明は、糖新生遺伝子の不活性化を通じて菌株生産を改善するための手段を提供する。これらの好ましいいくつかの態様において、不活性化された糖新生遺伝子は、pckA、gapB、およびfbp～なる群より選択される。

10

【0020】

本発明は、少なくとも一つのバチルス由来の関心のあるタンパク質の発現を増強するための以下の工程を含む方法を提供する。すなわち、関心のあるタンパク質を生産することが可能な改変バチルス菌株を得、ここで改変バチルス菌株は不活性化されたpckA染色体遺伝子を有し、および発現が未改変バチルス宿主菌株における関心のあるタンパク質の発現と比べて増強されている関心のあるタンパク質が改変バチルス菌株により発現されるような条件下で改変バチルス菌株を増殖する工程を含む方法である。更なる態様において改変バチルス菌株は更に、sbo、slr、ybcO、csn、spolISA、sigB、phrC、rapA、CssS、trpA、trpB、trpC、trpD、trpE、trpF、tdh/kbl、alsD、sigD、prpC、gapB、fbp、rocA、ycgN、ycgM、rocFおよびrocDからなる群より選択される少なくとも一つの不活性化された染色体遺伝子を含み、発現が未改変バチルス宿主菌株における関心のあるタンパク質の発現と比べて増強される。関心のあるタンパク質が改変バチルス菌株によって発現されるような条件下で改変バチルス菌株を増殖する。いくつかの態様において、関心のあるタンパク質は相同タンパクおよび異種タンパクからなる群より選択される。いくつかの態様において、関心あるタンパクは、プロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼおよびホスファターゼから選択され、一方で他の態様において関心のあるタンパク質は抗体、ホルモンおよび成長因子からなる群より選択される。いくつかの特に好ましい態様において、関心のあるタンパク質はプロテアーゼである。いくつかの追加的な態様において、改変バチルス菌株はpckAの欠失によって得られ、一方で他の態様において、改変バチルス菌株は更に、sbo、slr、ybcO、csn、spolISA、sigB、phrC、rapA、CssS、trpA、trpB、trpC、trpD、trpE、trpF、tdh/kbl、alsD、sigD、prpC、gapB、fbp、rocA、ycgN、ycgM、rocF、およびrocDからなる群より選択される1つ以上の染色体遺伝子の欠失によって得られる。

20

30

【0021】

また本発明は、本発明に記述された方法を用いて得られる改変バチルス菌株を提供する。いくつかの好ましい態様において、改変バチルス菌株はpckA遺伝子の染色体欠失を含み、一方、他の態様において改変バチルス菌株は更にsbo、slr、ybcO、csn、spolISA、sigB、phrC、rapA、CssS、trpA、trpB、trpC、trpD、trpE、trpF、tdh/kbl、alsD、sigD、prpC、gapB、fbp、rocA、ycgN、ycgM、rocF、およびrocDからなる群より選択される1つ以上の染色体遺伝子の欠失を含む。いくつかの態様において、1つより多くのこれらの染色体遺伝子が除去されている。いくつかの特に好ましい態様において、改変菌株はバチルス・スプチルス菌株である。追加的な好ましい態様において、改変バチルス菌株は、プロテアーゼ生産菌株である。いくつかの特に好ましい態様において、プロテアーゼはスプチリシンである。更に追加的な態様において、スプチリシンはスプチリシン168、スプチリシンBPN'、スプチリシン・カールスバーグ、スプチリ

40

50

シンD Y、スプチリシン147、スプチリシン309、およびそれらの変異体からなる群より選択される。また更なる態様において、改変バチルス菌株は更に、deg U、deg Q、deg S、sco C4、spo l l E、およびopp Aからなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子、または複数の突然変異を含む。いくつかの特に好ましい態様において、改変バチルス菌株は更に関心のある異種タンパクを含む。

【0022】

また本発明は、pck A遺伝子を含むDNA構築体を提供する。追加的な態様において、本発明は、sbo、slr、ybc O、csn、spo l l SA、sig B、phr C、rap A、Css S、trp A、trp B、trp C、trp D、trp E、trp F、tdh/kbl、als D、sig D、prp C、gap B、fbp、roc A、ycg N、ycg M、roc F、およびroc D、それらの遺伝子断片、およびそれらとの相同配列からなる群から選択される少なくとも一つの遺伝子を更に含むDNA構築体を提供する。いくつかの好ましい態様において前記DNA構築体は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号39、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号50、配列番号37、配列番号25、配列番号21、配列番号50、配列番号29、配列番号23、配列番号27、配列番号19、配列番号31、配列番号48、配列番号46、配列番号35、および配列番号33からなる群より選択される少なくとも一つの核酸を含む。いくつかの態様において前記DNA構築体は、更に少なくとも一つの関心のあるタンパク質をコードする少なくとも一つのポリヌクレオチド配列を含む。

【0023】

また本発明は、DNA構築体を含むプラスミドを提供する。更なる態様において、本発明はDNA構築体を含むプラスミドを含む宿主細胞を提供する。いくつかの態様において、前記宿主細胞は、バチルス細胞および大腸菌細胞からなる群より選択される。いくつかの好ましい態様において、前記宿主細胞はバチルス・スプチルスである。いくつかの特に好ましい態様において、DNA構築体は宿主細胞の染色体に組み込まれている。他の態様において、DNA構築体は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47、配列番号49、配列番号51、配列番号38、配列番号26、配列番号22、配列番号57、配列番号30、配列番号24、配列番号28、配列番号20、配列番号32、配列番号55、配列番号53、配列番号36、および配列番号34からなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸配列をコードする少なくとも一つの遺伝子を含む。追加的な態様において、DNA構築体はさらに少なくとも一つの選択的マーカーを含む。ここで前記選択的マーカーは、遺伝子断片またはそれらと相同な遺伝子配列によってそれぞれの横に位置する。

【0024】

また本発明は、関心のあるタンパク質をコードする核酸を含む外来配列を含んだDNA構築体、およびpck A遺伝子のコーディング領域に直接隣接する配列と80～100%の配列同一性を有する核酸配列を含むホモロジーボックスを用いてそれぞれに隣接した選択マーカーを提供する。追加的な態様において、外来配列は更に、sbo、slr、ybc O、csn、spo l l SA、sig B、phr C、rap A、Css S、trp A、trp B、trp C、trp D、trp E、trp F、tdh/kbl、als D、sig D、prp C、gap B、fbp、roc A、ycg N、ycg M、roc F、およびroc Dからなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子を含む。いくつかの態様において、前記DNA構築体はさらに、遺伝子のコード配列に隣接する少なくとも一つの核酸を含む。また本発明は、DNA構築体を含むプラスミドを提供する。更なる態様において、本発明は、DNA構築体を含むプラスミドを含む宿主細胞を提供する。いくつかの態様において、前記宿主細胞は、バチルス細胞および大腸菌細胞からなる群より選択される。いくつかの好ましい態様において、宿主細胞はバチルス・スプチルスである。いくつかの

特に好ましい態様において、前記DNA構築体は宿主細胞の染色体に組み込まれる。更に好ましい態様において、前記選択マーカーは宿主細胞染色体から切り出されている。

【0025】

本発明は更に、強化されたプロテアーゼ生産を有する改変バチルス菌株を得るための以下の工程を含む方法を提供する。すなわち、本発明の少なくとも一つのDNA構築体を用いたバチルス宿主細胞を形質転換し、ここでDNA構築体における関心のあるタンパク質はプロテアーゼであり、およびDNA構築体は、少なくとも一つの遺伝子が改変バチルス菌株を生産するために不活性化されるような条件下でバチルス宿主細胞の染色体に組み込まれる工程、および強化されたプロテアーゼ生産が得られるような条件下で改変バチルス菌株を増殖する工程を含む方法である。いくつかの特に好ましい態様において、前記方法は更にプロテアーゼを回収する工程を含む。他の好ましい態様において、少なくとも一つの不活性化遺伝子は改変バチルス菌株の染色体から欠失される。本発明はまた、本発明に記述した方法を用いて生産される改変バチルス菌株を提供する。いくつかの態様において、バチルス宿主菌株は、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・レントゥス、バチルス・スプチルス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・ブレビス、バチルス・ステアロテルモフィルス、バチルス・アルカロフィルス、バチルス・コアグランス、バチルス・サーキュランス、バチルス・プミルス、バチルス・ラトゥス、バチルス・クラウシ、バチルス・メガテリウム、およびバチルス・チューリングエンシスからなる群より選択される。いくつかの好ましい態様において、前記バチルス宿主細胞はバチルス・スプチルスである。

10

20

【0026】

本発明はまた、改変バチルスにおける増強されたプロテアーゼの発現のための以下の工程を含む方法を提供する。すなわち、本発明のDNA構築体を用いてバチルス宿主細胞を形質転換する工程、DNA構築体およびバチルス宿主細胞の染色体領域の相同組換えを可能とし、ここで改変バチルス菌株を生産するために少なくとも一つのバチルス宿主細胞の染色体遺伝子が不活性化される工程、およびプロテアーゼの発現のために好適な条件下で改変バチルス菌株を増殖し、ここでプロテアーゼの生産が形質転換に先立つバチルス・スプチルス宿主とくらべて改変バチルス・スプチルス宿主においてより大きい工程を含む方法である。いくつかの好ましい態様において、前記プロテアーゼはスプチリシンである。追加的な態様において、前記プロテアーゼは組み換えプロテアーゼである。さらに更なる態様において、不活性化は、少なくとも一つの遺伝子の欠失により達成される。また更なる態様において、不活性化は少なくとも一つの遺伝子の挿入不活性化により達成される。本発明はまた、本発明に記述される方法を用いて得られた改変バチルス菌株を提供する。いくつかの態様において、改変バチルス菌株は不活性化されたpckA遺伝子を含む。追加的な態様において、改変バチルス菌株はさらに、sbo、slr、ybcO、csn、spolISA、sigB、phrC、rapA、CssS、trpA、trpB、trpC、trpD、trpE、trpF、tdh/kbl、alsD、sigD、prpC、gapB、fbp、rocA、ycgN、ycgM、rocF、およびrocDからなる群より選択された少なくとも一つの不活性化される遺伝子を含む。いくつかの好ましい態様において、不活性化された遺伝子は欠失により不活性化されている。追加的な態様において、改変バチルス菌株は更に、degU、degS、degQ、scoc4、spolIE、およびoppAからなる群より選択される遺伝子における少なくとも一つの突然変異を含む。いくつかの好ましい態様において、前記突然変異はdegU(Hy)32である。また更なる態様において、前記菌株は組み換えプロテアーゼ生産菌株である。いくつかの好ましい態様において、前記改変バチルス菌株は、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・レントゥス、バチルス・スプチルス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・ブレビス、バチルス・ステアロテルモフィルス、バチルス・アルカロフィルス、バチルス・コアグランス、バチルス・サーキュランス、バチルス・プミルス、バチルス・ラトゥス、バチルス・クラウシ、バチルス・メガテリウム、およびバチルス・チューリングエンシスからなる群より選択される。

30

40

50

【0027】

本発明はまた、1つ以上の常在染色体領域またはそれらの断片の欠失を含む改変バチルス菌株を提供する。ここで常在染色体領域は、約0.5k~500kbを含み、および改変および未改変バチルス菌株が基本的に同じ培養条件下で増殖する場合、改変バチルス菌株は対応する未改変バチルス菌株と比べて強化された関心のあるタンパク質の発現レベルを有する。好ましい態様において、前記改変バチルス菌株はバチルス・リケニフォルミス、バチルス・レントゥス、バチルス・スプチルス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・プレビス、バチルス・ステアロテルモフィルス、バチルス・アルカロフィルス、バチルス・コアグランス、バチルス・サーキュランス、バチルス・プミルス、バチルス・ラトゥス、バチルス・クラウシ、バチルス・メガテリウム、およびバチルス・チューリングエンシスからなる群より選択される。いくつかの好ましい態様において、前記改変バチルス菌株は、バチルス・スプチルス、バチルス・リケニフォルミス、およびバチルス・アミロリケファシエンスからなる群より選択される。いくつかの特に好ましい態様において、改変バチルス菌株はバチルス・スプチルス菌株である。また更なる態様において、前記常在染色体領域はPBSX領域、皮膚領域、プロファージ7領域、SPβ領域、プロファージ1領域、プロファージ2領域、プロファージ3領域、プロファージ4領域、プロファージ5領域、プロファージ6領域、PPS領域、PKS領域、yvfF-yveK領域、DHB領域、およびそれらの断片からなる群より選択される。いくつかの好ましい態様において、二つの常在染色体領域またはそれらの断片は欠失されている。いくつかの態様において、少なくとも一つの関心のあるタンパク質は、プロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼおよびホスファターゼから選択され、一方、他の態様において関心のあるタンパク質は、抗体、ホルモンおよび成長因子からなる群から選択される。また、追加的な態様において、関心のあるタンパク質はプロテアーゼである。いくつかの好ましい態様において、プロテアーゼはスプチリシンである。いくつかの特に好ましい態様において、スプチリシンはスプチリシン168、スプチリシンBPN'、スプチリシン・カールスバーク、スプチリシンDY、スプチリシン147、スプチリシン309、およびそれらの変異体からなる群より選択される。更に好ましい態様において、前記バチルス宿主細胞は組み換え菌株である。いくつかの特に好ましい態様において、前記改変バチルス菌株は、degU、degQ、degS、scoc4、spol1E、およびoppAからなる群より選択される遺伝子における少なくとも一つ突然変異を含む。いくつかの好ましい態様において、前記突然変異はdegU(Hy)32である。

【0028】

本発明は更に、PBSX領域、皮膚領域、プロファージ7領域、SPβ領域、プロファージ1領域、プロファージ2領域、プロファージ3領域、プロファージ4領域、プロファージ5領域、プロファージ6領域、PPS領域、PKS領域、yvfF-yveK領域、DHB領域、およびそれらの断片からなる群より選択される常在染色体領域の欠失を含むプロテアーゼ生産バチルス菌株を提供する。いくつかの好ましい態様において、前記プロテアーゼはスプチリシンである。いくつかの態様において、前記プロテアーゼは異種プロテアーゼである。いくつかの特に好ましい態様において、前記改変バチルス菌株は、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・レントゥス、バチルス・スプチルス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・プレビス、バチルス・ステアロテルモフィルス、バチルス・アルカロフィルス、バチルス・コアグランス、バチルス・サーキュランス、バチルス・プミルス、バチルス・ラトゥス、バチルス・クラウシ、バチルス・メガテリウム、およびバチルス・チューリングエンシスからなる群より選択される。追加的な態様において、バチルス菌株はバチルス・スプチルス菌株である。

【0029】

また本発明は、バチルスにおける関心のあるタンパク質の発現を強化する、以下の工程を含む方法を提供する。すなわち、選択マーカーおよび不活性化された染色体部分を含んだDNA構築体をバチルス宿主菌株へ導入し、ここでDNA構築体はバチルス宿主菌株の染

色体に組み込まれ、改変バチルス菌株を生産するためにバチルス宿主細胞からの常在染色体領域またはその断片の欠失をもたらす工程、および好適な条件下で改変バチルス菌株を増殖し、ここで関心のあるタンパク質の発現が、改変されていないバチルス宿主細胞における関心のあるタンパク質の発現に比べて改変バチルス菌株においてより大きい工程を含む方法である。いくつかの好ましい態様において、前記方法は更に関心のあるタンパク質を回収する工程を含む。いくつかの態様において、前記方法は更に改変バチルス菌株から選択マーカーを切り出す工程を含む。追加的な態様において、前記常在染色体領域は P B S X、皮膚、プロファージ 7、S P β 、プロファージ 1、プロファージ 2、プロファージ 3、プロファージ 4、プロファージ 5、プロファージ 6、P P S、P K S、y v f F-y v e K、D H B、およびそれらの断片からなる群より選択される。更なる態様において、前記改変バチルス菌株は少なくとも二つの常在染色体領域の欠失を含む。いくつかの好ましい態様において、関心のあるタンパク質は酵素である。いくつかの態様において、関心のあるタンパク質はプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼおよびホスファターゼから選択され、一方、他の態様において関心のあるタンパク質は、抗体、ホルモンおよび成長因子からなる群から選択される。いくつかの態様において、前記バチルス宿主菌株はバチルス・リケニフォルミス、バチルス・レントゥス、バチルス・スブチルス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・ブレビス、バチルス・ステアロテルモフィルス、バチルス・クラウシ、バチルス・アルカロフィルス、バチルス・コアグランス、バチルス・サーキュランス、バチルス・プミルス、およびバチルス・チューリングイエンスからなる群より選択される。本発明はまた、本発明に記述した方法を用いて生産された改変バチルス菌株を提供する。

10

20

【0030】

また本発明は、バチルス菌株から関心のあるタンパク質を得るための、以下の工程を含む方法を提供する。すなわち、選択マーカーおよび不活性化された染色体部分を含む D N A 構築体を用いてバチルス宿主細胞を形質転換し、ここで前記 D N A 構築体はバチルス菌株の染色体に組み込まれ、改変バチルス菌株を生産するために常在染色体領域またはその断片の欠失を生じる工程、関心のあるタンパク質の発現を可能とする好適な培養条件下で改変バチルス菌株を増殖する工程、および関心のあるタンパク質を回収する工程を含む方法である。いくつかの好ましい態様において、関心のあるタンパク質は酵素である。いくつかの特に好ましい態様において、バチルス宿主は関心のあるタンパク質をコードする異種遺伝子を含む。追加的な態様において、バチルス宿主細胞はバチルス・リケニフォルミス、バチルス・レントゥス、バチルス・スブチルス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・ブレビス、バチルス・ステアロテルモフィルス、バチルス・クラウシ、バチルス・アルカロフィルス、バチルス・コアグランス、バチルス・サーキュランス、バチルス・プミルス、およびバチルス・チューリングイエンスからなる群より選択される。いくつかの好ましい態様において、前記常在染色体領域は P B S X、皮膚、プロファージ 7、S P β 、プロファージ 1、プロファージ 2、プロファージ 3、プロファージ 4、プロファージ 5、プロファージ 6、P P S、P K S、y v f F-y v e K、D H B、およびそれらの断片からなる群より選択される。いくつかの特に好ましい領域において、前記改変バチルス菌株はさらに、d e g U、d e g Q、d e g S、s c o C 4、s p o l l E、および o p p A からなる群より選択される遺伝子における少なくとも一つの突然変異を含む。いくつかの態様において、関心のあるタンパク質はプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼおよびホスファターゼからなる群から選択される酵素である。いくつかの特に好ましい態様において、酵素はプロテアーゼである。いくつかの好ましい態様において、関心のあるタンパク質は酵素である。他の態様において、関心のあるタンパク質は、抗体、ホルモンおよび成長因子からなる群から選択される。

30

40

【0031】

更に本発明はバチルスにおける関心のあるタンパク質の発現を強化するための以下の工

50

程を含む方法を提供する。すなわち、少なくとも一つのバチルス細胞から核酸を得る工程、少なくとも一つの関心ある遺伝子を同定するために、前記バチルス細胞由来の核酸についてトランスクリプトームDNAアレイ分析を行う工程、DNA構築体を生産するために少なくとも一つの関心のある遺伝子を修飾する工程、および改変バチルス菌株を生産するためにDNA構築体をバチルス宿主細胞に組み込む工程を含む方法である。ここで前記改変バチルス菌株は、改変されてないバチルスにおける関心のあるタンパク質の発現に比べて、関心のあるタンパク質の発現が強化されるような条件下で関心のあるタンパク質を生産することが可能である。いくつかの態様において、関心のあるタンパク質は、アミノ酸合成経路および生分解経路を含む群より選択される少なくとも一つの生化学的経路と関連する。いくつかの態様において、前記方法は少なくとも一つの生分解経路の無効化することを含む。いくつかの態様において、生分解経路は、関心ある遺伝子の転写のために無効になる。しかしながら、このことにより、前記方法が関心のあるタンパク質の強化された発現が引き起こす細胞内部における他の生化学的経路の修飾に利用されると考えられるように、本発明がこれらの経路に制限されることを意味しない。いくつかの特に好ましい態様において、前記バチルス宿主は関心のあるタンパク質をコードする異種遺伝子を含む。追加的な態様において、前記バチルス宿主細胞はバチルス・リケニフォルミス、バチルス・レントゥス、バチルス・スブチルス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・ブレビス、バチルス・ステアロテルモフィルス、バチルス・クラウシ、バチルス・アルカロフィルス、バチルス・コアグランス、バチルス・サーキュランス、バチルス・プミルス、およびバチルス・チューリングイエンスからなる群より選択される。いくつかの態様において、前記関心のあるタンパク質は酵素である。いくつかの好ましい態様において、前記関心のあるタンパク質はプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼおよびホスファターゼから選択され、一方、他の態様において関心のあるタンパク質は、抗体、ホルモンおよび成長因子からなる群から選択される。

【0032】

更に本発明は、バチルスにおける関心のあるタンパク質の発現を強化するための以下の工程を含む方法を提供する。すなわち、少なくとも一つのバチルス細胞から少なくとも一つの関心のある遺伝子を含む核酸を得る工程、前記核酸を断片化する工程、前記少なくとも一つの関心のある遺伝子を含む増幅された断片のプールを生産するために前記断片を増幅する工程、DNA構築体を生産するために前記増幅した断片を結合する工程、改変バチルス菌株を生産するために前記DNA構築体をバチルス宿主細胞へ直接的に形質転換する工程、および改変されていないバチルスにおける前記関心のあるタンパク質の発現と比べて、前記関心のあるタンパク質の発現が強化されるような条件下で前記改変バチルス菌株を増殖する工程を含む方法である。いくつかの好ましい態様において、前記増幅はポリメラーゼ連鎖反応の利用を含む。いくつかの態様において、改変バチルス菌株は、prpC、sigD、およびtdh/kb1からなる群より選択される修飾遺伝子を含む。いくつかの特に好ましい態様において、前記バチルス宿主は関心あるタンパク質をコードする異種遺伝子を含む。追加的な態様において、前記バチルス宿主細胞は、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・レントゥス、バチルス・スブチルス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・ブレビス、バチルス・ステアロテルモフィルス、バチルス・クラウシ、バチルス・アルカロフィルス、バチルス・コアグランス、バチルス・サーキュランス、バチルス・プミルス、およびバチルス・チューリングイエンスからなる群より選択される。いくつかの態様において、前記関心のあるタンパク質は酵素である。いくつかの好ましい態様において、前記関心のあるタンパク質はプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、リパーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、キナーゼおよびホスファターゼから選択され、一方、他の態様において関心のあるタンパク質は、抗体、ホルモンおよび成長因子からなる群より選択される。

【0033】

更に本発明は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列

番号 1 1、配列番号 1 3、配列番号 1 5、配列番号 3 9、配列番号 4 0、配列番号 4 2、配列番号 4 4、配列番号 4 6、配列番号 4 8、配列番号 5 0、配列番号 3 7、配列番号 2 5、配列番号 2 1、配列番号 5 0、配列番号 2 3、配列番号 2 7、配列番号 1 9、配列番号 3 1、配列番号 4 8、配列番号 4 6、配列番号 3 5、および配列番号 3 3 からなる群より選択される核酸配列に示された配列を含む単離核酸を提供する。

【0034】

また本発明は、アミノ酸をコードする単離核酸配列を提供する。ここで前記アミノ酸は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 4 1、配列番号 4 3、配列番号 4 5、配列番号 4 7、配列番号 4 9、配列番号 5 1、配列番号 3 8、配列番号 2 6、配列番号 2 2、配列番号 5 7、配列番号 2 4、配列番号 2 8、配列番号 2 0、配列番号 3 2、配列番号 5 5、配列番号 5 3、配列番号 3 6、および配列番号 3 4 からなる群より選択される。

10

【0035】

更に本発明は単離アミノ酸配列を提供する。ここで前記アミノ酸配列は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 4 1、配列番号 4 3、配列番号 4 5、配列番号 4 7、配列番号 4 9、配列番号 5 1、配列番号 3 8、配列番号 2 6、配列番号 2 2、配列番号 5 7、配列番号 2 4、配列番号 2 8、配列番号 2 0、配列番号 3 2、配列番号 5 5、配列番号 5 3、配列番号 3 6、および配列番号 3 4 からなる群より選択される。

【発明を実施するための最良の形態】

20

【0036】

図面の簡単な説明

図 1. パネル A および B は、本発明によって提供される 1 つの方法（「方法 1」実施例 1 を参照されたい）の一般的な概念図を示す。この方法において、遺伝子に隣接する領域および／または常在染色体領域は野生型バチルス染色体外で増幅され、制限酵素（少なくとも BamH I を含む）を用いて切断され、および p J M 1 0 2 へ結合される。前記構築体は大腸菌によりクローン化され、そのプラスミドは単離され、BamH I を用いて線状化され、相補末端を用いて抗菌マーカに結合される。大腸菌における再度のクローニングの後、液体カルチャーが培養され、バチルス宿主菌株（好ましくはコンピテントなバチルス宿主菌株）の形質転換プラスミド DNA を単離するために使用される。

30

【0037】

図 2 は、本発明のいくつかの態様に従った DNA カセットの構築において使用されるプライマーの位置を示す。この図は本発明で使用したプライマー表記システムの説明を提供する。プライマー 1 および 4 は、欠失の存在を点検するために使用される。これらのプライマーは、「DeletionX-UF-chk」および「DeletionX-UR-chk-del」と呼ばれる。DeletionX-UF-chk はまた、染色体におけるカセットの存在の陽性チェック用の、抗菌マーカ（プライマー 1 1：例えば、PBSX-UR-chk-Del と呼ばれる）内のリバースプライマーを用いた PCR 反応において使用される。プライマー 2 および 6 は、前記上流隣接領域を増幅するために使用される。これらのプライマーは「DeletionX-UF」および「DeletionX-UR」と呼ばれ、ブラック・バーティカル・バー（black vertical bar）における組換え制限部位を含む。プライマー 5 および 8 は下流隣接領域の増幅に使用される。これらのプライマーは「DeletionX-DF」および「DeletionX-DR」と呼ばれる。これらのプライマーは、連結およびクローニング用の操作された BamH I 部位、あるいは PCR 融合用のバチルス・スプチルス染色体の適切な部分と相同である 2 5 塩基対テイルのいずれかを含むことが可能である。いくつかの態様において、プライマー 3 および 7 は PCR 溶解によって作製されたカセットの場合と同様、カセットを融合するために使用されるが、一方、他の態様において挿入の存在を点検するために使用される。これらのプライマーは「DeletionX-UF-nested」および「DeletionX-DR-nested」と呼ばれる。いくつかの態様において、「

40

50

抗菌マーカー」に対応する配列は、S p c 耐性マーカーであり、除去される領域は c s s S 遺伝子である。

【0038】

図3は、本発明の一つの方法（「方法2」、実施例2を参照されたい）の一般的な概念図である。隣接領域は、選択マーカー配列に相補的な配列の25bpを含むように操作される。前記選択マーカー配列はまた、1つの隣接領域のDNAに相補的な25bp末端を含む。隣接領域の末端付近のプライマーは、単一の反応管において、全3つのテンプレートを増幅するために使用され、それによって融合断片が作られる。この融合断片またはDNA構築体は、コンピテントなバチルス宿主菌株に直接形質転換される。

【0039】

図4は、バチルスDHB欠失クローンの電気泳動ゲルを示す。レーン1および2は、プライマー1および11を用いて増幅されたDHB欠失を保有する二つの菌株、および不活性化された染色体部分の上流からフレオマイシンマーカーへ増幅された1.2kbバンドを示す。レーン3はこの反応についての野生型コントロールを示す。非特異的な増幅のみが観察される。レーン4および5は、プライマー9および12を用いて増幅されるDHB欠失菌株を示す。この2kbバンドは、不活性化された染色体部分の抗菌領域を通じて下流部分以下まで増幅する。レーン6はこの反応のための負のコントロールであり、バンドは示されていない。レーン7および8は、プライマー1および4を用いて増幅される欠失菌株を示し、図によりDHB領域が欠落していることが確認できる。レーン9は野生型コントロールである。

【0040】

図5は、slrがslr遺伝子の欠失をもたらすフレオマイシン（phleo）マーカーによって置換されるバチルス・スプチルス（野生型）の生産菌株の二つのクローンのゲル電気泳動を示す。レーン1および2は、位置1および11におけるプライマーを用いて増幅されたクローンを示す。レーン3は、同一のプライマーを用いて増幅された野生型染色体DNAである。1.2kbバンドは、挿入について観察される。レーン4および5は、位置9および12におけるプライマーを用いて増幅されたクローンを示す。レーン6は、同一のプライマーを用いて増幅された野生型染色体DNAである。正しい形質転換体は2kbバンドを含む。レーン7および8は、位置2および4におけるプライマーを用いて増幅されたクローンを示す。レーン9は、同一のプライマーを用いて増幅された野生型染色体DNAである。欠失菌株についてバンドは観察されないが、約1kbのバンドが野生型において観察される。参照は、プライマー位置の説明のために図2でなされる。

【0041】

図6は、cssSがスペクチノマイシンマーカーを染色体へ組み込むことにより不活性化されるバチルス・スプチルス（野生型）の生産菌株のクローンの電気泳動ゲルを示す。レーン1は組込みのないコントロールであり、約1.5kb小さい。

【0042】

図7は、バチルス・スプチルス野生型菌株（未改変）および対応する種々の欠失を有する改変バチルス・スプチルス菌株を含む振動フラスコの培養液から測定された、改善されたスプチリシン分泌を示す棒グラフを示す。プロテアーゼ活性（g/L）は、17、24、および40時間後に測定、または24時間および40時間で測定された。

【0043】

図8は、バチルス・スプチルス野生型菌株（未改変）および対応する改変欠失菌株（-sbo）および（-slr）における振動フラスコの培養液から測定された、改善されたプロテアーゼ分泌を示す棒グラフを示す。プロテアーゼ活性（g/L）は、17、24、および40時間後に測定された。

【0044】

図9は、コントロール菌株およびpckA欠失菌株によって作られた円光の写真を示す。

【0045】

10

20

30

40

50

図10. パネルAは、時間ごとの(「EFT」は発酵経過時間のことを言う)最小培地で培養された親菌株およびpckA菌株の光学密度のグラフを示す。このグラフが示すように、pckA欠失菌株は親菌株よりも短い期間でより多くの増殖を生じた。図10. パネルBは、時間ごとのグラム/リッターで表示された栄養培地で培養された親菌株およびpckA欠失菌株の力価のグラフを示す。図10. パネルCは、栄養培地で培養された親菌株およびpckA欠失菌株の炭素生産のグラフを示す。このパネルに示されるように、pckA欠失菌株は炭素利用においてより効率的であった。

【0046】

発明の説明

本発明は、発現タンパクを生産するために改変された能力を有するように遺伝子操作されている細胞を提供する。特に本発明は、1つ以上の染色体遺伝子が不活性化あるいは修飾された、少なくとも一つの関心のあるタンパク質の強化された発現を示すバチルス種のようなグラム陽性菌に関する。特に好ましい態様において、pckA遺伝子是不活性化あるいは修飾される。いくつかの好ましい態様において、1つ以上の染色体遺伝子は修飾および/またはバチルス染色体から欠失されている。いくつかの更なる態様において、1つ以上の常在染色体領域は、対応する野生型バチルス宿主染色体から欠失されている。好ましい態様において、少なくともpckA遺伝子を含む領域は、バチルス染色体から欠失される。

【0047】

定義

本発明で言及される全ての特許および出版物は、それらの特許および出版物において開示された全ての配列を含めて、参照により明示的に本発明に組み込まれる。特記のない限り、本発明で使用される全ての専門および科学用語は、本発明が属する当該技術分野における当業者によって一般に理解されている意味と同一の意味を有する(例えば、シングレトン(Singleton)他、「微生物学および分子生物学辞典」第2版、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社、ニューヨーク[1994年]、およびヘイおよびマーハム(Hale and Marham)「ハーパーコリンズ生物学辞典」ハーパーペレニアル社、ニューヨーク[1991年]を参照。どちらも当業者に本発明で使用される多くの用語の一般的辞書を提供する)。本発明において記述されたものと類似または同等の方法および材料が、本発明の実施または試験に用いることが可能であったとしても、その好ましい方法および材料が記述されている。数値域は、範囲を定義した数値を含む。本発明および添付のクレームにおいて使用されるように、単数形には、文中に他に明確な指定がない限り、複数の意味が含まれる。従って、例えば、「宿主細胞」にはそのような宿主細胞の複数個が含まれる。

【0048】

特記のない限り、核酸は5'から3'方向に左から右に、アミノ酸配列はアミノからカルボキシ方向に左から右へ、それぞれ記述される。本発明で提供される見出しは、全体として本明細書の参照により含まれ得る本発明の種々の様相または態様に限定されない。次に定義する用語は全体として明細書の参照によってより十分に定義される。

【0049】

本発明で使用される「宿主細胞」は、新たに導入されるDNA配列のための宿主または発現媒体として働く能力を有する細胞のことを言う。本発明の好ましい態様において、宿主細胞はバチルス種または大腸菌細胞である。

【0050】

本発明で使用される「バチルス属」には、バチルス・スブチルス、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・レントゥス、バチルス・ブレビス、バチルス・ステアロテルモフィルス、バチルス・アルカロフィルス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・クラウシ、バチルス・ハロデュランス、バチルス・メガテリウム、バチルス・コアグランス、バチルス・サーキュランス、バチルス・ラウトゥス、およびバチルス・チューリングエンシスが含まれるがこれらに限定されない、当業者に知られて「バチルス」属内の全ての種

が含まれる。バチルス属は、分類上の再編成が進行中であることが知られている。従って、この属には、現在「ゲオバチルス・ステアロテルモフィルス (*Geobacillus stearothermophilus*)」と命名されているバチルス・ステアロテルモフィルスのような生物体が含まれるが、これに限定されない再編成されている種が含まれることを意図している。酸素の存在下における耐性内生孢子の生産は、バチルス族の重要な特徴であると考えられる。もっとも、この特徴はまた近年命名されたアリサイクロバチルス (*Alicyclobacillus*)、アムフィバチルス (*Amphibacillus*)、アネウリニバチルス (*Aneurinibacillus*)、アノキシバチルス (*Anoxybacillus*)、ブレビバチルス (*Brevibacillus*)、フィロバチルス (*Filobacillus*)、グラシリバチルス (*Gracililibacillus*)、ハロバチルス (*Halobacillus*)、パエニバチルス (*Paenibacillus*)、サリバチルス (*Salibacillus*)、テルモバチルス (*Thermobacillus*)、ウレイバチルス (*Ureibacillus*) およびヴィルギバチルス (*Virgibacillus*) にも当てはまる。

【0051】

本発明で使用される「核酸」は、センスまたはアンチセンス鎖を示すか否かにかかわらず、二本鎖または単鎖であり得るゲノム起源または合成起源のDNA、cDNA、およびRNAと同様に、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列、およびそれらの断片または部分のことを言う。遺伝子コードの縮重の結果として、多数のヌクレオチド配列は所定のタンパク質をコードすることができると理解される。

【0052】

本発明で使用される「遺伝子」という用語は、コード化領域（例えば、個々のコード化部分 (exons) 間の介在配列 (introns) 同様、5' 非翻訳 (5' UTR) またはリーダー配列および3' 非翻訳 (3' UTR) またはトレーラー (trailer) 配列) に先立つおよび続く領域を含み、または含み得ないポリペプチド鎖を生産することに関与するDNAの染色体部分を意味する。

【0053】

いくつかの態様において前記遺伝子は、ワクチンおよび抗体と同様に、成長因子、サイトカイン、リガンド、レセプターおよび阻害剤のような、治療上重要なタンパク質またはペプチドをコードする。前記遺伝子は、酵素（例えば、プロテアーゼ、アミラーゼおよびグルコアミラーゼのようなカルボヒドラーゼ、セルラーゼ、オキシダーゼおよびリパーゼ）のような商業的に重要な工業上のタンパク質またはペプチドをコードすることができる。しかしながら、このことにより本発明がいかなる特定の酵素またはタンパク質に制限されることを意味しない。いくつかの態様において関心のある遺伝子は自然発生遺伝子であり、一方、他の態様においてそれは突然変異遺伝子または合成遺伝子である。

【0054】

本発明で使用される「ベクター」という用語は、細胞において複製でき、および新しい遺伝子またはDNA部分を細胞に運ぶことができる任意の核酸のことを言う。従って、この用語は、異なる宿主細胞間へ移送するように作られた核酸構築体のことを言う。「発現ベクター」は、異質細胞における異種DNA断片を組み込み、および発現する能力を有するベクターのことを言う。多くの原核生物および真核生物の発現ベクターは商業的に入手できる。適切な発現ベクターの選択は当業者の有する知識の範囲内である。

【0055】

本発明で使用される「DNA構築体」、「発現カセット」および「発現ベクター」という用語は、標的細胞（すなわち、上記のように、ベクター、ベクター要素が存在する）における特定の核酸の転写を可能にする一連の特別な核酸要素を用いた、組換え的にまたは合成的に生成された核酸構築体のことを言う。組換え発現カセットはプラスミド、染色体、ミトコンドリアDNA、色素体DNA、ウイルス、または核酸断片に組み込むことが可能である。典型的には、発現ベクターの組換え発現カセット部分には、他の配列の中でも転写される核酸配列およびプロモーターが含まれる。いくつかの態様において、DNA構

築体にはまた、標的細胞の特定の核酸の転写を可能とする一連の特別な核酸要素が含まれる。ある態様において、本発明のDNA構築体は本発明で定義された選択マーカーおよび不活性化された染色体を含む。

【0056】

本発明で使用される「形質転換DNA」、「形質転換配列」および「DNA構築体」は、配列を宿主細胞または生物体へ導入するために使用されるDNAのことを言う。形質転換DNAは、配列を宿主細胞または生物体へ導入するために使用されるDNAである。このDNAはPCRまたは任意のその他の適切な技術によって *in vitro* で生産することができる。いくつかの好ましい態様において、前記形質転換DNAは外来配列を含み、一方、他の好ましい態様において更にホモロジーボックスに隣接した外来配列を含む。また更なる態様において、前記形質転換DNAは末端（すなわち、スタッファー（*stuffer*）配列またはフランク（*flanks*））に追加される他の非相同配列を含む。この末端は、例えばベクターへの挿入のように、形質転換DNAが閉じた環を形成するように閉環できる。

10

【0057】

本発明で使用される「プラスミド」という用語は、クローニング・ベクターとして使用される環状二本鎖（*ds*）DNAのことを言い、それは多くの細菌およびいくつかの真核生物において染色体外自己複製遺伝因子を形成する。いくつかの態様において、プラスミドは宿主細胞のゲノムに組み込まれるようになる。

【0058】

本発明で使用される「単離された」および「精製された」という用語は、自然に関連する少なくとも一つの成分から除去された核酸またはアミノ酸（または他の成分）のことを言う。

20

【0059】

本発明で使用される「増強された発現」は、関心のあるタンパク質の増強された生産を含むように広く解釈される。増強された発現は、本発明の教示に従って改変されてない、しかし基本的に同一の培養条件下で増殖された対応する宿主菌株における通常の発現レベルを上回る発現である。

【0060】

いくつかの好ましい態様において、「増強」は所望の特性の増大をもたらす任意の修飾によって達成される。例えば、いくつかの特に好ましい態様において、本発明は親菌株（例えば、野生型および／または出発菌株）よりも大量のおよび／または高品質の関心あるタンパク質を生産する増強された菌株のような、タンパク質生産を増強するための手段を提供する。

30

【0061】

本発明で使用される「発現」という用語は、ポリペプチドが遺伝子の核酸配列に基づいて生産される工程のことを言う。前記工程には、転写および翻訳の両方が含まれる。

【0062】

核酸配列の細胞への導入についての文脈において本発明で使用される「導入された」という用語は、核酸配列を細胞へ移入するために適切な任意の方法のことを言う。そのような導入方法には、プロトプラスト融合、形質移入、形質転換、接合、および形質導入が含まれるが、これらに限定されるわけではない（例えば、フェラーリ（*Ferrari*）他、「遺伝学」、ハードウッド（*Hardwood*）他編『バチルス』、プレナム出版社、[1989年] 57-72頁を参照されたい）。

40

【0063】

本発明で使用される「形質転換された」および「安定的に形質転換された」という用語は、そのゲノムに組み込まれた非天然型（異種の）ポリヌクレオチド配列を有する、または少なくとも二世代にわたり維持されるエピソームプラスミドとして有する細胞のことを言う。

【0064】

50

本発明で使用される「外来配列」は、バチルス染色体に導入されるDNA配列のことを言う。いくつかの好ましい態様において、外来配列はDNA構築体の部分である。好ましい態様において、外来配列は1つ以上の関心のあるタンパク質をコードする。いくつかの態様において、外来配列は形質転換される細胞のゲノムにすでに存在するか否かの配列を含む（すなわち、それは相同的または異種的な配列となり得る）。いくつかの態様において、外来配列は関心のある1つ以上のタンパク質、遺伝子、および／または突然変異または修飾された遺伝子をコードする。他の態様において、外来配列は、野生型の機能遺伝子またはオペロン、突然変異した機能遺伝子またはオペロン、または非機能的遺伝子またはオペロンをコードする。いくつかの態様において、非機能的配列は遺伝子機能の混乱のために遺伝子に組込まれることが可能である。いくつかの態様において外来配列は1つ以上の機能的な野生型遺伝子をコードし、一方、他の態様において外来配列は1つ以上の機能的な突然変異遺伝子をコードし、および更に追加的な態様において外来配列は1つ以上の非機能的な遺伝子をコードする。他の態様において、外来配列は形質転換される宿主細胞の染色体にすでに存在する配列をコードする。好ましい態様において、外来配列には *pc k A* 遺伝子が含まれる、一方、他の好ましい態様において、外来配列には更に、 *s b o*、 *s l r*、 *y b c O*、 *c s n*、 *s p o l l S A*、 *p h r C*、 *s i g B*、 *r a p A*、 *C s s S*、 *t r p A*、 *t r p B*、 *t r p C*、 *t r p D*、 *t r p E*、 *t r p F*、 *t d h*／*k b l*、 *a l s D*、 *s i g D*、 *p r p C*、 *g a p B*、 *f b p*、 *r o c A*、 *y c g N*、 *y c g M*、 *r o c F*、 および *r o c D*、 およびそれらの断片からなる群より選択された少なくとも一つの遺伝子が含まれる。更なる態様において、外来配列は選択マーカーを含む。更なる態様において、外来配列は二つのホモロジーボックスを含む。

10

20

【0065】

いくつかの態様において、前記外来配列にはホルモン、酵素および成長因子が含まれるがこれに限定されない少なくとも1つの異種タンパクをコードする。他の態様において、前記酵素にはプロテアーゼ、エステラーゼ、リパーゼ、フェノールオキシダーゼ、パーミアゼ、アミラーゼ、ブルナーゼ、セルラーゼ、グルコース、イソメラーゼ、ラッカーゼ、およびタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのようなヒドロラーゼが含まれるが、これに限定されない。

【0066】

本発明で使用される「ホモロジーボックス」は、バチルス染色体における配列と相同である核酸配列のことを言う。より具体的には、ホモロジーボックスは、本発明に従って不活性化される遺伝子または遺伝子の部分に直接隣接するコード領域と、約80から100%の間の配列同一性、約90から100%の間の配列同一性、または約95から100%の間の配列同一性を有する上流または下流領域である。これらの配列は、バチルス染色体においてDNA構築体が組み込まれる場所を指示し、およびバチルス染色体のどの部分が外来配列によって置き換えられるかを指示する。他方、本発明を限定するものではないが、ホモロジーボックスは約1塩基対 (bp) から200キロ塩基 (kb) を含むことができる。好ましくはホモロジーボックスには、約1bp～10kb、1bp～5.0kb、1bp～2.5kb、1bp～1.0kb、および0.25kbから2.5kbが含まれる。またホモロジーボックスには、約10kb、5.0kb、2.5kb、2.0kb、1.5kb、1.0kb、0.5kb、0.25kb、および0.1kbが含まれ得る。いくつかの態様において、選択マーカーの5' および／または3' 末端はホモロジーボックスに隣接し、ここでホモロジーボックスは遺伝子のコード領域に直接隣接する核酸配列を含む。

30

40

【0067】

本発明で使用される「選択可能マーカーをコードするヌクレオチド配列」という用語は、宿主細胞において発現が可能なヌクレオチド配列のことを言い、そこで選択可能マーカーの発現は、対応する選択的試薬の存在または必須栄養素の欠如下において成長する能力を発現遺伝子を含む細胞に与える。

【0068】

50

本発明で使用される「選択可能マーカー」および「選択マーカー」という用語は、ベクターを含むそれらの宿主の選択を容易にする宿主細胞における発現を可能とする核酸（例えば、遺伝子）のことを言う。そのような選択可能マーカーの事例には、抗菌剤が含まれるがこれに限定されない。従って、「選択可能マーカー」という用語は、宿主細胞が関心のある外来DNAを取り込み、または他のいくつかの反応が生じたことを示す遺伝子のことを言う。典型的には、選択可能マーカーは、形質転換の間どんな外因性の配列も受け取らなかった細胞から外因性DNAを含む細胞を区別することを可能とするために、抗菌薬耐性または代謝優位性を宿主細胞に与える遺伝子である。「常在選択可能マーカー」は形質転換される微生物の染色体に位置している。常在選択可能マーカーは、形質転換DNA構築体における選択可能マーカーと異なる遺伝子をコードする。選択マーカーは当業者に周知である。上記に示したように、好ましくは前記マーカーは抗菌薬耐性マーカーである（例えば、amp^R、phl^R、spec^R、kan^R、ery^R、tet^R、cmp^R、およびneo^Rである。例えば、Guerot-Fleury「遺伝子」167巻、335-337頁[1995年]、パルメロス(Palmeros)他、「遺伝子」247巻、255-264頁[2000年]、およびTrieu-Cuot他、「遺伝子」24巻、331-341頁[1983年]を参照されたい)。いくつかの特に好ましい態様において、本発明はクロラムフェニコール耐性遺伝子（例えば、バチルス・リケニフォルミスゲノムに存在する耐性遺伝子だけでなく、pC194に存在する遺伝子）を提供する。この耐性遺伝子は、染色体的に組み込まれたカセットおよび組み込みプラスミドの染色体増幅を含む態様においてだけでなく、本発明において特に有用である（例えば、AlbertiniおよびGalizzi、「バクテリオロジー」162巻、1203-1211頁[1985年]およびスタールおよびフェラーリ(Stahl and Ferrarì)「ジャーナル・オブ・バクテリオロジー」158巻、411-418頁[1984年]を参照されたい)。この自然発生のクロラムフェニコール耐性遺伝子のDNA配列を以下に示す。

【0069】

【表1】

```
ATGAATTTTCAAACAATCGAGCTTGACACATGGTATAGAAAATCTTATTTTGACCATTA
CATGAAGGAAGCGAAATGTTCTTTGAGCATCACGGCAAACGTCAATGTGACAAATTTG
CTCGCGGTGCTCAAGAAAAAGAAGCTCAAGCTGTATCCGGCTTTTATTTATATCGTAT
CAAGGGTCATTTCATTGCGGCCCTGAGTTTAGAACAAACGTTTGATGACAAAGGAAGCT
GGGTTATTGGGAACAAATGCATCCGTGCTATGCGATTTTTCATCAGGACGACCAAAC
GTTTTCCGCCCTCTGGACGGAATACTCAGACGATTTTTCGCGAGTTTATCATCAATAT
CTTCTGGACGCCGAGCGCTTTGGAGACAAAAGGGGCCTTTGGGCTAAGCCGGACAT
CCCGCCCAATACGTTTTTCAGTTTCTTCTATTCCATGGGTGCGCTTTTCAACATTCAATT
TAAACCTTGATAACAGCGAACACTTGCTGCCGATTATTACAAACGGGAAATACTTTTC
AGAAGGCAGGGAAACATTTTTGCCCCGTTTCTGCAAGTTCACCATGCAGTGTGTGAC
GGCTATCATGCCGGCGCTTTTATAA (SEQ ID NO:58).
```

【0070】

このクロラムフェニコール耐性タンパクの推定アミノ酸配列は、

【表2】

```
MNFQTIELDTWYRKSYFDHYMKEAKCSFSITANVNVNLLAVLKKKKLKLPAFIYIVSRVI
HSRPEFRITTFDDKGYWEQMHPCYAIFHQDDQTF SALWTEYSDDFSQFYHQYLLDA
ERFGDKRGLWAKPDIPPNTFSVSSIPWVRFSTFNLNLDNSEHLLPIITNGKYFSEGRETF
PVSCKFTMQCVTAIMPALL (SEQ ID NO:59).
```

【0071】

本発明に従ったその他の有用なマーカーには、トリプトファンのような栄養要求性マーカーおよびβ-ガラクトシダーゼのような検出マーカーが含まれるが、これに限定されない。

10

20

30

40

50

【0072】

本発明で使用される「プロモーター」は、下流遺伝子の転写を指示するために機能する核酸配列のことを言う。好ましい態様において前記プロモーターは、そこにおいて標的遺伝子が発現される宿主細胞に好適である。前記プロモーターは、他の転写および翻訳調節核酸配列（「コントロール配列」とも称される）と共に、所定の遺伝子を発現するために必要である。一般に、前記転写および翻訳調節配列には、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始および停止配列、翻訳開始および停止配列、およびエンハンサーまたはアクチベーター配列が含まれるがこれに限定されない。

【0073】

核酸は、他の核酸配列と機能的関係に置かれるとき、「操作可能に結合」される。例えば、分泌リーダー（すなわちシグナルペプチド）をコードするDNAは、それがポリペプチドの分泌物に関与するプレタンパク質として発現されるとき、ポリペプチド用のDNAと操作可能に結合される。プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすとき、コード配列に操作可能に結合される。または、リボソーム結合部位は、それが翻訳を促進するために位置するとき、コード配列に操作可能に結合される。一般に、「操作可能に結合される」というのは、結合されたDNA配列が近接しており、および分泌リーダーの場合、近接しており、リーディング相にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは近接している必要はない。結合は、都合のよい制限酵素認識部位での連結によって達成される。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーは従来の実施に従って用いられる。

【0074】

「不活性化」の用語には、pckA遺伝子単独の、またはsbo、slr、ybcO、csn、spolISA、sigB、phrC、rapA、CssS、trpA、trpB、trpC、trpD、trpE、trpF、tdh/kbl、alsD、sigD、prpC、gapB、fbp、rocA、ycgN、ycgM、rocF、およびrocD染色体遺伝子の1つ以上と組合わせた機能的発現を防ぐ任意の方法が含まれ、ここで前記遺伝子または遺伝子産物はその既知の機能を発揮することができない。不活性化または増強は、核酸遺伝子配列における欠失、置換（例えば、突然変異）、中断、および／または挿入を含む任意の適切な手段を経由して生じる。ある態様において、不活性化された遺伝子の発現産物は、タンパク質の生物活性において対応する変化を有する切断されたタンパク質である。いくつかの態様において、生物活性における変化は活性の増大であり、一方、好ましい態様において前記変化は生物活性の喪失をもたらす。いくつかの態様において、改変バチルス菌株は、好ましくは安定で非可逆性の不活性化をもたらす1つ以上の遺伝子の不活性化を含む。

いくつかの好ましい態様において不活性化は欠失によって達成される。いくつかの好ましい態様において、前記遺伝子は相同組換えによって欠失される。例えば、いくつかの態様において、sboが欠失されるべき遺伝子であるとき、ホモロジーボックスの両横に隣接する選択マーカを有する外来配列を含むDNA構築体が用いられる。ホモロジーボックスは染色体のsbo遺伝子領域に隣接する核酸と相同であるヌクレオチド配列を含む。DNA構築体は、バチルス宿主染色体の相同配列に整列し、ダブルクロスオーバー現象においてsbo遺伝子は宿主染色体から切り出される。

【0075】

本発明で使用される遺伝子の「欠失」は、コード配列全体の欠失、コード配列の一部の欠失、または隣接領域を含むコード配列の欠失のことを言う。染色体に残った配列が遺伝子の所望の生物活性を提供するならば、欠失は部分的であり得る。コード配列の隣接領域には、5'および3'末端において1bp～約500bpを含むことが可能である。隣接領域は500bpよりも大きくなり得るが、好ましくは本発明に従って不活性化、または欠失される領域における他の遺伝子を含まないことになる。結局、欠失された遺伝子は実効的に非機能的である。簡単に言えば、「欠失」は、1つ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸残基がそれぞれ除去されている（すなわち、非存在である）ヌクレオチドまたはアミ

ノ酸配列における変化と定義される。従って、「欠失突然変異体」はそれぞれの野生型生物よりも少ないヌクレオチドまたはアミノ酸を有する。

【0076】

本発明の更に他の態様において、DNAアレイ分析（例えば、本発明に記述されるようなトランスクリプトーム分析）によって決定される不適切な時における遺伝子活性の欠失は生成タンパクの増強された発現を示す。いくつかの好ましい態様において本発明はpckA遺伝子の欠失を提供し、一方、代替的な好ましい態様においてgapB、fbp、および／またはalsDを含む群より選択される一つ以上の遺伝子の欠失は原料利用の効率改善のために改良された菌株を提供する。本発明で使用される「トランスクリプトーム分析」は、遺伝子転写の分析のことを言う。

10

【0077】

本発明の他の態様において、遺伝子は、この欠失が所望の生産物の増大した発現をもたらす制限された配列の欠失によって「最適化される」と考えられる。本発明のいくつかの好ましい態様において、トリプトファンオペロン（すなわち、trpA、trpB、trpC、trpD、trpE、trpFの遺伝子を含む）は、TRAP結合RNA配列をコードするDNA配列の欠失によって最適化される（ヤングその他、ジャーナル・オブ・モル・バイオロジー（J Mol. Biol）270巻、696-710頁[1997年]を参照されたい）。この欠失は宿主菌株からの所望の生成物の発現を増加させるために考慮される。

【0078】

他の好ましい態様において、不活性化は挿入によるものである。例えば、いくつかの態様において、pckAが不活性化される遺伝子である時、DNA構築体は選択マーカーによって中断されたpckA遺伝子を有する外来配列を含む。前記選択マーカーは、pckAをコードする配列の部分の両横に位置することとなる。前記DNA構築体は、宿主染色体におけるpckA遺伝子と基本的に同一の配列と一致し、ダブル・クロスオーバー現象においてpckA遺伝子は選択マーカーの挿入によって不活性化される。簡単に言えば「挿入」または「追加」は、天然由来の配列と比してそれぞれ1つ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の追加をもたらす、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列における変化である。

20

【0079】

他の態様において、活性化はベクターとしてプラスミドを用いたシングルクロスオーバー現象における挿入によるものである。例えば、pckA染色体遺伝子は、遺伝子または遺伝子コード配列の一部および選択マーカーを含むプラスミドと共に整列される。いくつかの態様において、選択マーカーは遺伝子コード配列内部または遺伝子から分離したプラスミドの一部に位置する。前記ベクターはバチルス染色体に組み込まれ、前記遺伝子はコード配列におけるベクターの挿入によって不活性化される。

30

【0080】

代替的な態様において、不活性化は遺伝子の突然変異のために生じる。突然変異遺伝子の方法は当業者に周知であり、部位特異的突然変異、ランダム突然変異の生成、およびギャップドデュプレックス（gapped-duplex）法を含むが、これに限定されない（例えば、米国特許US4,760,025号、モリング（Moring）他、バイオテクノロジー（Biotech）. 2巻：646頁[1984年]、およびクレイマー（Kramer）その他、核酸研究（Nucleic Acid Res.）、12巻：9441頁[1984年]を参照されたい）。

40

【0081】

本発明で使用される「置換」は異なるヌクレオチドまたはアミノ酸による1つ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸それぞれの置換の結果として生じる。

【0082】

本発明で使用される「相同遺伝子」は、相互に対応し、相互に同一または非常に類似するが通常関連種からの遺伝子のペアのことを言う。この用語には、遺伝子の複製によって

50

分離された遺伝子（例えば、パラログ遺伝子）だけでなく、種分化によって分離される遺伝子（すなわち新種の発展）（例えば、オーソログ遺伝子）が含まれる。

【0083】

本発明で使用される「オーソログ」および「オーソログ遺伝子」は、種分化による共通の先祖遺伝子（すなわち、相同遺伝子）から進化した異なる種における遺伝子のことを言う。典型的には、オーソログは進化の過程において同一の機能を保つ。オーソログの同定は、新たに配列決定されたゲノムにおける遺伝子機能の信頼できる予測へ利用される。

【0084】

本発明で使用される「パラログ」および「パラログ遺伝子」は、ゲノム内での複製に係る遺伝子のことを言う。オーソログが進化の過程を通じて同一の機能を保持するのに対して、いくつかの機能がしばしば起源の機能に関連しているとは言え、パラログは新機能を進化させている。パラログ遺伝子の具体例には、全てのセリンプロテイナーゼであり、同一種内で同時に発生するトリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ、およびトロンピンをコード化する遺伝子が、含まれるがこれに限定されない。

【0085】

本発明で使用される「ホモログ」は、好ましい同一性を有する配列の類似性または同一性のことを言う。このホモログは、当該技術分野で既知の標準的技術を用いて決定される（例えば、スミスおよびウォーターマン、Adv. Appl. Math.、2巻：482頁[1981年]、ニードルマンおよびWunsch、J. Mol. Biol.、48巻：443頁[1970年]、ピアソン（Pearson）およびリップマン、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85巻：2444頁[1988年]、ウィスコンシン・ジェネティクス・ソフトウェア・パッケージ（ジェネティクス・コンピュータグループ、マジソン、ウィスコンシン州）におけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTAのようなプログラム、およびデブロー（Devereux）他、Nucleic Acid Res.、12巻：387-395頁[1984年]を参照されたい）。

【0086】

本発明で使用される「類似配列」は、遺伝子の機能がバチルス・スブチルス菌株168から命名された遺伝子と実質的に同一である。更に類似遺伝子は、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%または100%のバチルス・スブチルス菌株168遺伝子の配列との配列同一性を含む。代替的に、類似配列はバチルス・スブチルス168領域において見出される遺伝子の70~100%と一致し、および／またはバチルス・スブチルス168染色体における遺伝子と一致する領域において見出された少なくとも5~10の遺伝子を有する。追加的な態様において、1つ以上の上記の特性はその配列に当てはまる。類似配列は、配列アラインメントの既知の方法によって決定される。一般的に使用されるアラインメント法は、前述および以下の通りBLASTであるが、配列をアラインすることに利用できる他の方法もまた存在する。

【0087】

有用なアルゴリズムの一例は、PILEUPである。PILEUPは、進歩的ペアワイズ・アラインメントを用いて関連する配列グループから多数の配列アラインメントを生成する。それはまたアラインメントを作るために用いられるクラスター関係を示す系統図をプロットすることが可能である。PILEUPは、フェングおよびドゥートル（Feng and Doolittle）、J. Mol. Evol.、35巻：351-360頁、[1987年]の進歩的アラインメント法の簡易化された方法を用いる。この方法は、ヒギンスおよびシャープ（Higgins and Sharp、CABIOS、5巻：151-153頁[1989年]によって記述された方法と類似である。3.00のデフォルト・ギャップ・ウェイト、0.10のデフォルト・ギャップ・レンジ・ウェイトを含む有益なPILEUPパラメータには、末端ギャップが荷重されている。

【0088】

10

20

30

40

50

他の有用なアルゴリズムの例はBLASTアルゴリズムであり、アルツシュル他 (Altschul) 他、J. Mol. Biol.、215巻：403-410頁、[1990年]、およびカーリン他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻：5873-5877頁 [1993年]) によって記述されている。特に有用なBLASTプログラムは、WU-BLAST-2プログラムである (アルツシュル他、Meth. Enzymol.、266巻：460-480頁 [1996年])。WU-BLAST-2は、いくつかのサーチ・パラメータを用いるが、それらのほとんどはデフォルト値に設定される。調整パラメータは次の値を用いて設定される：すなわち、重複スパン=1、重複フラクション=0.125、ワード閾値 (T)=11である。HSP SおよびHSP S2パラメータはダイナミック値であり、特定の配列の組成および関心ある配列が検索される特定のデータベースの組成に応じてプログラム自体によって設定される。しかしながら、前記値は感度を増大するように調整することができる。A%のアミノ酸配列同一性値は、アラインされた領域における「より長い」配列の残基の総数で除した同一残基に符合する数によって決定される。「より長い」配列は、アラインされた領域における最も実際の残基を有する配列である (アラインメントスコアを最大化するためにWU-BLAST-2によって導入されたギャップは無視される)。

【0089】

従って「パーセント (%) 核酸配列同一性」は、核酸数値に示される配列のヌクレオチド残基と同一の候補配列におけるヌクレオチド残基のパーセンテージと定義される。好ましい方法は、重複スパンおよび重複フラクションそれぞれ1および0.125で、デフォルト・パラメータに設定したWU-BLAST-2のBLASTNモジュールを使用する。

【0090】

前記アラインメントはアラインされる配列におけるギャップの導入を含むことができる。更に、核酸数値のそれよりも多いかまたは少ないヌクレオシドを含む配列については、ホモログのパーセンテージはヌクレオシド総数に対するホモログヌクレオシド数に基づいて決定されることになる。従って、例えば、配列のホモログは本発明で同定された配列のものよりも短く、以下に議論するように、より短い配列におけるヌクレオシドの数を用いて決定されることになる。

【0091】

本発明で使用される「ハイブリダイゼーション」という用語は、当該技術分野に既知である塩基対形成を通じて核酸鎖が相補鎖に結合する過程のことを言う。

【0092】

中程度から高程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーションおよび洗浄条件のもとで、二つの配列が特異的に相互にハイブリダイズするなら、核酸配列は参照核酸配列に「選択的にハイブリダイズする」と見なされる。ハイブリダイゼーションの条件は、核酸結合複合体またはプローブの融解温度 (T_m) に基づく。例えば、「最大ストリンジェンシー」は、典型的には T_m -約 5°C (プローブの T_m より 5°C 下回る) で生じる。「高度ストリンジェンシー」とは、 T_m より約 5°C から 10°C 下回るところでの、「中度ストリンジェンシー」とは、プローブの T_m より約 10°C から 20°C 下回るところでの、および「低度ストリンジェンシー」とは T_m より約 20°C から 25°C 下回るところで生じる。機能的には、最大ストリンジェンシー条件は、ハイブリダイゼーション・プローブとの、厳密なまたはほぼ厳密な同一性を有する配列を同定するために使用することができ、他方、中度または低度ストリンジェンシー・ハイブリダイゼーションは、ポリヌクレオチド配列ホモログを同定または検出するために使用することができる。

【0093】

中度および高度ストリンジェンシー・ハイブリダイゼーションの条件は、当該技術分野で周知である。高度ストリンジェンシー条件の具体例には、 42°C での50%のホルムアミド、 $5\times\text{SSC}$ 、 $5\times$ デンハート溶液、0.5%のSDSおよび $100\mu\text{g/ml}$ の変性担体DNAでのハイブリダイゼーション、それに続く室温、 $2\times\text{SSC}$ および0.5%のSDSによる2回の洗浄、および 42°C 、 $0.1\times\text{SSC}$ および0.5%SDSにおけ

る二回の追加の洗浄が含まれる。中度ストリンジェンシー条件の具体例には、37℃、20%のホルムアミド含有溶液中、5×SSC（150mMのNaCl、15mMクエン酸三ナトリウム）50mMのリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハート溶液、10%のデキストラン硫酸塩および20mg/mlの変成、せん断されたサケ精子DNAにおける一晚のインキュベーション、それに続く約37–50℃での1×SSCにおけるフィルターの洗浄が含まれる。プローブの長さなどの調整要素に必要である温度、イオン強度等の調整方法は当業者に既知である。

【0094】

本発明で使用される「組み換え（recombinant）」には、異種核酸配列の導入によって修飾された、または修飾された細胞から生成した細胞またはそのベクターへの言及が含まれる。従って、例えば組み換え細胞は、細胞の未処理（非組み換え型）内において同一型が認められない遺伝子を発現し、または計画的な人間の介入の結果として発現し、または全く発現しない条件下で、そうでなければ異常に発現される未処理遺伝子を発現する。「組み換え」、「再結合」および「組換えられた」核酸の生成は、一般的にキメラ遺伝子を生じる二つ以上の核酸断片の集合である。

10

【0095】

好ましい態様において、変異DNA配列は少なくとも一つのコドンにおいて、部位飽和突然変異を用いて生成される。更なる態様において、変異DNA配列は野生型配列と、40%より高い、45%より高い、50%より高い、55%より高い、60%より高い、65%より高い、70%より高い、75%より高い、80%より高い、85%より高い、90%より高い、95%より高い、または98%より高い相同性を有する。代替的な態様において、変異DNAは、例えば照射、ニトロソグアニジンなどの任意の既知の変異原性操作を用いて、in vivoで生成される。次に、所望のDNA配列は単離され、本発明の操作された方法に用いられる。

20

【0096】

代替的な態様において、前記形質転換DNA配列には外来配列が存在しないホモロジーボックスが含まれる。この態様において、二つのホモロジーボックス間の内因性DNA配列を欠失することが望ましい。更に、いくつかの態様において、形質転換配列は野生型であり、一方、他の態様においてそれらは変異または修飾配列である。更に、いくつかの態様において、前記形質転換配列は相同であり、一方他の態様においてそれらは異種性である。

30

【0097】

本発明で使用される「標的配列」という用語は、外来配列が宿主細胞ゲノムに挿入されることが望ましい配列をコードする宿主細胞におけるDNA配列のことを言う。いくつかの態様において、標的配列は機能的な野生型遺伝子またはオペロンをコードし、一方、他の態様において標的配列は機能的な変異遺伝子またはオペロン、または非機能的な遺伝子またはオペロンをコードする。

【0098】

本発明で使用される「フランキング配列」は、議論されている配列（例えば、遺伝子A–B–Cについては、遺伝子BにAおよびC遺伝子配列が隣接している）の上流または下流にある任意の配列のことを言う。好ましい態様において、前記外来配列はその両横にホモロジーボックスが隣接する。他の態様において、前記外来配列およびホモロジーボックスは、その両横にスタッパー配列が隣接するユニットを含む。いくつかの好ましい態様において、フランキング配列は一方の横（3'または5'）にのみ存在するが、好ましい形態においてそれは両横に位置する配列が隣接する。各ホモロジーボックスの配列はバチルス染色体における配列に相同である。これらの配列は、バチルス染色体のどこで新しい構築体が組み込まれ、およびバチルス染色体のどの部分が外来配列によって置換されることになるかを指示する。好ましい態様において、選択マーカーの5'および3'末端は、不活性化染色体部分の切片を含むポリヌクレオチド配列に隣接する。いくつかの態様においてフランキング配列は単一側（3'または5'）にのみ存在し、一方、好ましい態様に

40

50

においてそれは隣接する配列の両側に存在する。

【0099】

本発明で使用される「スタッファー配列」という用語は、ホモロジーボックス（典型的には、ベクター配列）の横に位置する任意の特別なDNAのことを言う。しかしながら、前記用語は任意の非相同DNA配列を含む。任意の理論によって限定されないことを前提として、スタッファー配列はDNA取り込みを開始する細胞に重要でない標的を提供する。

【0100】

本発明で使用される「突然変異体ライブラリ」という用語は、それらのゲノムのほとんどが同一でありながら、1つ以上の遺伝子の異なった相同体を含む細胞の母集団のことを言う。そのようなライブラリは例えば、改変された形質を有する遺伝子またはオペロンを同定するための方法へ利用される。 10

【0101】

本発明で使用される「ハイパー・コンピテント」および「スーパー・コンピテント」という用語は、細胞母集団の1%以上が染色体DNA（例えば、バチルスDNA）を用いて形質転換できることを意味する。代替的に前記用語は、細胞母集団の10%より多くが自己複製プラスミド（例えば、バチルス・プラスミド）を用いて形質転換できる細胞母集団の言及に用いられる。好ましくは、スーパー・コンピテント細胞は、野生型または親細胞母集団について観察されるよりも大きな比率で形質転換される。スーパー・コンピテントおよびハイパー・コンピテントは、本発明において互換的に使用される。 20

【0102】

本発明で使用される「増幅」および「遺伝子増幅」という用語は、増幅された遺伝子が当初ゲノムにおいて存在した遺伝子より高いコピー数で存在するようになるように、特定のDNA配列が不均一に複製される工程のことを言う。いくつかの態様において、薬剤（例えば、阻止可能酵素の阻害剤）の存在下で増殖による細胞の選択は、薬剤の存在の下で増殖のために必要とされる遺伝子産物をコードする内因性遺伝子の増幅、またはこの遺伝子産物をコードする外因性（すなわち、取り込み）配列の増幅によって必要とされる遺伝子産物をコードする内因性遺伝子の増幅、または両方の増幅をもたらす。

【0103】

「増幅」は、鋳型特異性を伴う核酸複製の特別な場合である。それは非特異的鋳型複製（すなわち、鋳型に依拠するが特異的鋳型に依拠しない複製）と対比される。鋳型特異性は、本発明では複製の忠実度（すなわち、適切なヌクレオチド配列の合成）およびヌクレオチド（リボースまたはデオキシリボース）特異性と区別される。鋳型特異性は、しばしば「標的」特異性として記述される。標的配列は、それらが他の核酸から送別されることを追及するという意味で「標的」である。増幅技術は、当初この選別のために設計された。 30

【0104】

本発明で使用される「共増幅」は、他の遺伝子配列（すなわち、発現ベクター内に含まれるような1つ以上の非選択的遺伝子を含む遺伝子配列）とつなぎ合わせた増幅可能マーカの単一細胞への導入、および細胞が増幅可能マーカおよびその他の非選択可能遺伝子配列の両方を増幅するために適切な選択圧力の適用のことを言う。増幅可能マーカは他の遺伝子配列と物理的に連結し、または代替的に、一方は増幅可能マーカを含み、他方は非選択可能マーカを含む二つの分離したDNA断片を同一の細胞に導入することができる。 40

【0105】

本発明で使用される「増幅可能マーカ」、「増幅可能遺伝子」および「増幅ベクター」という用語は、適切な培養条件下で遺伝子の増幅を可能とする遺伝子をコードする遺伝子、またはベクターのことを言う。

【0106】

「鋳型特異性」は酵素の選択によりほとんどの増幅技術において達成される。増幅酵素は、それらが利用される条件下で、核酸の異種混合において核酸の特異的配列のみを加工 50

することになる酵素である。例えば、Q β レプリカーゼの場合、MDV-1 RNAはレプリカーゼにとって特異的鋳型である（例えば、カシャン（Kacian）他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、69巻：3038頁〔1972年〕を参照されたい）。その他の核酸はこの増幅酵素によって複製されない。同様にT7 RNAポリメラーゼの場合、この増幅酵素は自らのプロモーターに対して厳密な特異性を有する（チャンバーリン（Chamberlin）他、Nature 228巻：227頁〔1970年〕を参照されたい）。T4 DNAリガーゼの場合、連結接合部にオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド基質および鋳型の間のミスマッチがあると、前記酵素は二つのオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを連合しない。（ウーおよびワルラス（Wu and Wallace）、ゲノミクス、4巻：560頁〔1989年〕を参照されたい）。最後に、TaqおよびPfuポリメラーゼは、高温で機能するそれらの能力によって、プライマーにより結合され、またそれゆえ定義された配列に関して高い特異性を示すことが知られる。前記高温は、非標的配列を用いたハイブリダイゼーションではなく、標的配列を用いたプライマーハイブリダイゼーションに向けた熱力学的条件をもたらす。

10

【0107】

本発明で使用される「増幅可能な核酸」の用語は、任意の増幅法によって増幅することが可能な核酸のことを言う。「増幅可能な核酸」は通常「サンプル鋳型」を含むと考えられる。

【0108】

本発明で使用される「サンプル鋳型」という用語は、「標的」（以下に定義される）の存在について分析されるサンプル由来の核酸のことを言う。対照的に「バックグラウンド背景鋳型」は、サンプルに存在可能または不可能なサンプル鋳型以外の核酸に関して用いられる。背景鋳型は、最も頻繁に偶発的である。それはキャリーオーバーの結果、またはサンプルから精製排除されることが追求される核酸不純物の存在に依っている。例えば、検出されるべき生物体以外の生物体からの核酸は、試験サンプルにおけるバックグラウンドとして存在することができる。

20

【0109】

本発明における「プライマー」という用語は、精製された制限消化物における場合のように自然発生であるか、合成的生産かに拘わらず、核酸鎖と相補的であるプライマー伸長生産物の合成が誘発される条件下に置かれる場合（すなわち、ヌクレオチドおよびDNAポリメラーゼのような誘発剤の存在下、および適切な温度およびpHで）、合成の開始点として作用することができるオリゴヌクレオチドのことを言う。前記プライマーは増幅において最大限の効率を得るために好ましくは単鎖であるが、代替的に二重鎖でもよい。二重鎖の場合、前記プライマーは、伸張生産物の調製に用いられる以前に、最初にその鎖を分離するために処理される。好ましくは、前記プライマーはオリゴデオキシリボヌクレオチドである。前記プライマーは、誘発剤の存在下で拡張生産物の合成を準備するために十分に長くなくてはならない。前記プライマーの正確な長さは、温度、プライマー源、および手法の用途を含む多数の要素に依存する。

30

【0110】

本発明で使用される「プローブ」という用語は、精製された制限消化物におけるように自然発生であるか、または組換え的にまたはPCR増幅によって合成的に生産されたかに拘わらず、関心ある他のオリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチド（すなわち一つのヌクレオチド配列）のことを言う。一つのプローブは、単鎖または二重鎖であることが可能である。プローブは、特定の遺伝子配列の検出、同定、および単離に有用である。本発明に用いられる任意のプローブは、酵素（例えば、酵素組織化学アッセイと同様にELISA）、蛍光、放射、および発光システムを含むがそれに限定されない任意の検出システムにおいて検出可能であるために、任意の「レポーター分子」で標識化されることが考慮されている。本発明は、任意の特定の検出システムまたは標識に限定されることを意図しない。

40

【0111】

50

本発明で使用される「標的」という用語は、ポリメラーゼ連鎖反応に言及して用いられる場合、ポリメラーゼ連鎖反応のために用いられるプライマーによって結合される核酸の領域のことを言う。従って、「標的」は他の核酸配列から選別されることが追求される。「断片」は、標的配列内における核酸の領域として定義される。

【0112】

本発明で使用される「ポリメラーゼ連鎖反応」（「PCR」）という用語は、米国特許US. 4, 683, 195号、4, 683, 202号および4, 965, 188号の方法のことを言い、これらは参照により本発明に組み込まれる。この方法には、クローニングまたは精製をしないゲノムDNAの混合における標的配列部分の濃度を高めるための方法が含まれる。標的配列を増幅するためのこの工程は、望ましい標的配列を含むDNA混合物に対し大過剰な2つのオリゴヌクレオチドプライマーを導入すること、その後DNAポリメラーゼの存在下で温度サイクリングの正確な繰り返しを行うことからなる。2つのプライマーは、二重鎖標的配列の各鎖に対して相補的である。効果的な増殖のために、前記混合物は変性され、次に前記プライマーは標的分子内の相補配列にアニール（anneal）される。アニーリング（annealing）に続いて、前記プライマーは新しい一对の相補鎖を形成するように、ポリメラーゼを用いて延長される。変性、プライマーアニーリング、およびポリメラーゼ延長の工程は、望ましい標的配列の増幅された切片の高い濃度を得るために、幾度も繰り返すことができる（すなわち、変性、アニーリング、および延長は、1つの「サイクル」を構成し、多数の「サイクル」が存在し得る）。増幅された望ましい標的配列の切片の長さは相互のプライマーの相対的位置によって決定され、従ってこの長さはコントロール可能なパラメータである。この工程を繰り返すため、この方法は「ポリメラーゼ連鎖反応」（以下「PCR」）と言われる。望ましい増幅された標的配列の切片は、混合物において主要な配列（濃度の点で）となり、それらは「PCR増幅された」と称される。

10

20

【0113】

本発明で使用される「増幅試薬」は、プライマー、核酸鋳型および増幅酵素を除いた増幅に必要とされる試薬（デオキシリボヌクレオチド三リン酸、バッファー等）のことを言う。典型的には、他の反応成分と共に増幅試薬は、反応槽（試験管、マイクロウエル等）に置かれ、含まれる。

【0114】

PCRを用いて、ゲノムDNAの特定の標的配列の単一コピーを、いくつかの異なった方法（例えば、標識プローブを用いたハイブリダイゼーション、ビオチン化プライマーの取り込みとそれに続くアビジン酵素結合体検出、dCTPまたはdATPのような³²P標識デオキシヌクレオチド三リン酸の増幅切片への組み込み）によって検出できる水準まで増幅することが可能である。ゲノムDNAに加えて、任意のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列は、プライマー分子の適切なセットを用いて増幅することが可能である。特に、PCR工程によって生成された増幅部分は、それ自体が続くPCR増幅についての効率的な鋳型である。

30

【0115】

本発明で使用される「PCR生産物」、「PCR断片」および「増幅生産物」という用語は、変性、アニーリングおよび延長のPCR工程を2回以上完了後に得られた化合物の混合物のことを言う。これらの用語は1つ以上の標的配列の1つ以上の部分の増幅がある場合を含む。

40

【0116】

本発明で使用される「RT-PCR」という用語は、RNA配列の複製および増幅のことを言う。この方法において逆転写は、熱安定性ポリメラーゼが採用される一つの酵素操作を最も頻繁に用いるPCRと結合し、これは米国特許US 5, 322, 770号に記述され、参照により本発明に取り込まれる。RT-PCRにおいて、RNA鋳型はポリメラーゼの逆転写活性によりcDNAに変換され、次にポリメラーゼの重合活性を用いて増幅される（すなわち、他のPCR方法におけるように）。

50

【0117】

本発明で使用される「制限エンドヌクレアーゼ」および「制限酵素」という用語は、特定のヌクレオチド配列上に、またはそれに近接して、それぞれが二重鎖DNAを切断する細菌酵素のことを言う。

【0118】

「制限部位」は、所与の制限エンドヌクレアーゼによって認識および切断されたヌクレオチド配列のことを言い、それはしばしばDNA断片の挿入の部位である。本発明の一定の態様において、制限部位は選択マーカーおよびDNA構築体の5'および3'末端的に操作される。

【0119】

本発明で使用される「不活性染色体切片 (inactivated chromosomal segment)」には、二つの部分が含まれる。各部分には、本発明で定義されるように常在染色体領域に直接に隣接する上流または下流ゲノム染色体DNAと相同であるポリヌクレオチドが含まれる。「直接に隣接する」とは、不活性染色体切片を含むヌクレオチドに常在染色体領域を特徴付けるヌクレオチドが含まれないことを意味する。前記不活性染色体切片は、バチルス染色体のどこでDNA構築体が組み込まれ、およびバチルス染色体のどの部分が置換されることになるかを指示する。

【0120】

本発明で使用される「常在染色体領域 (indigenous chromosomal region)」および「常在染色体領域の断片」は、本発明のいくつかの態様において、バチルス宿主細胞から欠失されたバチルス染色体の切片のことを言う。一般に、「切片 (segment)」「領域 (region)」「部分 (section)」および「要素 (element)」は、本発明において殆ど同義に使用される。いくつかの態様において欠失された切片には既知の機能を有する1つ以上の遺伝子が含まれる、一方、他の態様において欠失された切片には未知の機能を有する1つ以上の遺伝子が含まれ、およびその他の態様において欠失された切片には既知および未知の機能を有する遺伝子の組合せが含まれる。いくつかの態様において、常在染色体領域またはそれらの断片には、200またはそれ以上もの遺伝子が含まれる。

【0121】

いくつかの態様において、常在染色体領域またはそれらの断片は一定の条件下で必要な機能を有するが、しかしその領域は実験室条件下のバチルス菌株の生存にとって必要ではない。好ましい実験室条件には、発酵槽、プレート培地上のシェイクフラスコ等における、標準温度および雰囲気条件 (例えば、好気性の) での増殖などの条件が含まれるが、これに限定されない。

【0122】

常在染色体領域またはそれらの断片には、約0.5 kb~500 kb、約1.0 kb~500 kb、約5 kb~500 kb、約10 kb~500 kb、約10 kb~200 kb、約10 kb~100 kb、約10 kb~50 kb、約100 kb~500 kb、約200 kb~500 kbのバチルス染色体の範囲を含むことができる。他の側面において、常在染色体領域またはその断片が欠失されているとき、改変バチルス菌株の染色体は、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、85%、80%、75%、または70%の対応する未改変バチルス宿主染色体を含むことができる。好ましくは、本発明に従って改変バチルス菌株の染色体には、約99~90%、99~92%、および98~94%の対応する未改変バチルス宿主菌株染色体ゲノムが含まれることになる。

【0123】

本発明で使用される「菌株生存度」は、生殖生存度のことを言う。常在染色体領域またはその断片の欠失は、実験室条件下で改変バチルス菌株の分裂および生存に有害に影響しない。

【0124】

10

20

30

40

50

本発明で使用される「改変バチルス菌株」は、遺伝的に操作されたバチルス種のことを言う。ここで実質的に同一の培養条件下で増殖された対応する未改変バチルス宿主菌株における同一の関心あるタンパク質の発現および／または生産と比べて、関心あるタンパク質は増強された発現および／または生産レベルを有する。いくつかの態様において、増強された発現レベルは1つ以上の染色体遺伝子の不活性化からもたらされる。ある態様において、増強された発現レベルは、1つ以上の染色体遺伝子の欠失からもたらされる。いくつかの態様において、改変バチルス菌株は、1つ以上の欠失された常在染色領域またはその断片を有する遺伝的に操作されたバチルス種である。ここで実質的に同一の培養条件下で増殖された対応する未改変バチルス宿主菌株と比べて、関心あるタンパク質は増強された発現または生産レベルを有する。代替的な態様において、増強された発現レベルは、1つ以上の染色体の挿入不活性化によってもたらされる。いくつかの代替的な態様において、増強された発現レベルは、活性増加または他の最適化された遺伝子によってもたらされる。いくつかの好ましい態様において、不活性遺伝子は *pckA* 遺伝子であり、一方、代替的な好ましい態様において前記不活性遺伝子は更に、*sbo*、*slr*、*ybcO*、*csn*、*spolISA*、*phrC*、*sigB*、*rapA*、*CssS*、*trpA*、*trpB*、*trpC*、*trpD*、*trpE*、*trpF*、*tdh*／*kbl*、*alsD*、*sigD*、*prpC*、*gapB*、*fbp*、*rocA*、*ycgN*、*ycgM*、*rocF*、および *rocD* からなる群から選択される。

【0125】

一定の態様において前記改変バチルス菌株は二つの不活性遺伝子を含み、一方、他の態様において三つの不活性遺伝子、四つの不活性遺伝子、五つの不活性遺伝子、六つの不活性遺伝子またはそれ以上が存在する。従って不活性遺伝子の数は、特定の遺伝子数に限定されることを意図しない。いくつかの態様において、前記不活性遺伝子は相互に隣接しており、一方、他の態様においてそれらはバチルス染色体の別々の領域に位置する。いくつかの態様において、不活性染色体遺伝子は一定の条件下で必要な機能を有するが、しかし実験室条件で前記遺伝子はバチルス菌株生存度にとって必要ではない。好ましい実験室条件には、微生物の増殖に適切な、発酵槽、シェイクフラスコ、プレート培地等での培養などの条件が含まれるが、これに限定されない。

【0126】

本発明で使用される「対応する未改変バチルス菌株」は、常在染色体領域またはその断片が欠失または修飾され、改変菌株が由来する宿主菌株である（例えば、出発菌株および／または野生型菌株）。

【0127】

本発明で使用される「染色体組込み」という用語は、それによって外来配列が宿主細胞（例えば、バチルス）の染色体に導入される工程のことを言う。形質転換DNAの相同領域は、染色体の相同領域をアラインする。続いて、ホモロジーボックス間の配列は、二重クロスオーバー（すなわち相同組換え）において外来配列によって置換される。本発明のいくつかの態様において、DNA構築体の不活性染色体切片の相同部分は、バチルス染色体の常在染色体領域の隣接相同領域をアラインする。続いて、常在染色体領域は二重クロスオーバー（すなわち相同組換え）において、DNA構築体によって欠失される。

【0128】

「相同組換え」は、同一の、またはほぼ同一のヌクレオチド配列部位において、二つのDNA分子または対の染色体間のDNA断片の交換を意味する。好ましい態様において、染色体組込みは相同組換えである。

【0129】

本発明で使用される「相同配列」は、比較のために最適にアラインしたとき、他の核酸またはポリペプチド配列と100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、88%、85%、80%、75%、または70%の配列同一性を有する核酸またはポリペプチドを意味する。いくつかの態様において相同配列は85%および100%の間の配列同一性を有し、一方、他の態様において90%およ

び100%の間の配列同一性があり、より好ましい態様において95%および100%の配列同一性がある。

【0130】

本発明で使用される「アミノ酸」は、ペプチドまたはタンパク質配列またはそれらの部分のことを言う。「タンパク質」「ペプチド」および「ポリペプチド」の用語は、互換的に使用される。

【0131】

本発明で使用される「関心あるタンパク質」および「関心あるポリペプチド」は、所望の、および／または評価されているタンパク質／ポリペプチドのことを言う。いくつかの態様において関心あるタンパク質は細胞内に発現し、一方、他の態様においてそれは分泌性ポリペプチドである。特に好ましいポリペプチドには、デンプン分解酵素、タンパク質分解酵素、セルロース分解(cel l u l y t i c)酵素、酸化還元酵素、および植物細胞壁分解酵素から選択される酵素が含まれるが、これに限定されない。より好ましくは、これらの酵素には、アミラーゼ、プロテアーゼ、キシナーゼ、リパーゼ、ラッカーゼ、フェノールオキシダーゼ、オキシダーゼ、クチナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、エステラーゼ、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、フィターゼ、ペクチナーゼ、グルコシダーゼ、イソメラーゼ、トランスフェラーゼ、ガラクトシダーゼ、およびキチナーゼが含まれるが、これに限定されない。本発明のいくつかの特に好ましい態様において、関心あるポリペプチドはプロテアーゼである。いくつかの態様において、関心あるタンパク質は、シグナルペプチド(すなわち、分泌タンパク質上のアミノ末端基延長)に融合する分泌性ポリペプチドである。殆ど全ての分泌性タンパクは、細胞膜を越えた前駆タンパクへのターゲティングおよび転位において重要な役割を演じるアミノ末端基タンパク延長を用いる。この延長は、細胞膜移動の間、または細胞膜移動直後に続いて、シグナルペプチダーゼによってタンパク質分解により除去される。

【0132】

本発明のいくつかの態様において、関心あるポリペプチドは、ホルモン、抗体、成長因子、受容体等から選択される。本発明に含まれるホルモンは、卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン放出因子、ソマトスタチン、性腺刺激ホルモン、バソプレッシン、オキシトシン、エリスロポエチン、インスリンなどであるが、これらに限定されない。成長因子には、血小板由来成長因子、インスリン様成長因子、表皮成長因子、神経成長因子、繊維芽細胞成長因子、形質転換成長因子、インターロイキン(例えば、IL-1からIL-13まで)、インターフェロン、コロニー刺激因子等のサイトカインが含まれるが、これらに限定されない。抗体には、抗体を生産するために望ましい任意の種から直接に得られた免疫グロブリンが含まれるが、これに限定されない。更に、本発明は修飾された抗体を含む。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体もまた本発明に含まれる。特に好ましい態様において、前記抗体はヒト抗体である。

【0133】

本発明で使用される「異種(heterologous)タンパク」という用語は、宿主細胞において自然由来でないタンパク質およびポリペプチドのことを言う。異種タンパクの例には、プロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼおよびリパーゼを含むヒドロラーゼ、ラセマーゼ、エピメラーゼ、トウトメラーゼまたはムターゼのようなイソメラーゼ、トランスファラーゼ、キナーゼ、およびフォファターゼのような酵素が含まれる。いくつかの態様において、前記タンパク質は、ワクチンおよび抗体と共に、成長因子、サイトカイン、リガンド、受容体および阻止剤を含むが、これらに限定されない治療上重要なタンパク質またはペプチドである。更なる態様において、前記タンパク質は商業的に重要な工業的タンパク質／ペプチドである(例えば、プロテアーゼ、アミラーゼおよびグルコアミラーゼのようなカルボヒドラーゼ、セルラーゼ、オキシダーゼ、およびリパーゼ)。いくつかの態様において、前記タンパク質をコードする遺伝子は自然由来の遺伝子であり、一方、他の態様において突然変異および／または合成遺伝子が用いられる。

10

20

30

40

50

【0134】

本発明で使用される「相同 (homologous) タンパク」は、細胞における未処理または自然発生のタンパク質およびポリペプチドのことを言う。好ましい態様において、前記細胞はグラム陽性細胞であり、一方、特に好ましい態様において前記細胞はバチルス宿主細胞である。代替的な態様において、相同タンパクは大腸菌を含むがこれに限定されない他の生物体によって産生された天然タンパクである。本発明は、組換えDNA技術を経由して相同タンパクを生産する宿主細胞を含む。

【0135】

本発明で使用される「オペロン領域」には、通常のプロモーターから単一転写単位として転写され、共制御 (coregulation) におかれる隣接遺伝子の一群が含まれる。いくつかの態様において、前記オペロンには調節遺伝子が含まれる。最も好ましい態様において、RNAレベルで高度に発現するが、しかし未知のまたは不要な機能を有するオペロンが使用される。

【0136】

本発明で使用される「多数隣接単一遺伝子領域」は、少なくとも二つの遺伝子のコード領域が直列に生じ、およびいくつかの態様において、コード領域に先行および続く介在配列を含む。いくつかの態様において抗菌領域を含む。

【0137】

本発明で使用される「抗菌領域」は、抗菌タンパクをコードする少なくとも一つの遺伝子を含む領域である。

【0138】

発明の詳細な説明

本発明は、pckA遺伝子が修飾または欠失された発現タンパク質を生産するために改変された能力を有するように遺伝子操作されている細胞を提供する。特に本発明は、1つ以上の染色体遺伝子が修飾および／または不活性化された（例えば、pckA）、および好ましくは1つ以上の染色体遺伝子（例えば、pckA）が、修飾および／またはバチルス染色体から欠失された関心のあるタンパク質の増強された発現を有するバチルス種のようなグラム陽性菌に関する。いくつかの更なる態様において、1つ以上の常在染色体領域は修飾および／または対応する野生型バチルス宿主染色体から欠失されている。好ましい態様において、そのような欠失は関心あるタンパク質の改善された生産のような利点を提供する。

【0139】

A. 遺伝子欠失

上述したように、本発明には大きな染色体欠失と同様に、単一または多数の遺伝子欠失および／または突然変異を含む態様が含まれる。

【0140】

いくつかの好ましい態様において、本発明は外来配列からなるDNA構築体を含む。DNA構築体は、in vitroで構築され、DNA構築体がバチルス染色体に組み込まれるようになるためにコンピテント・バチルス宿主へ構築体が直接クローニングされる。例えば、PCR融合および／または連結は、in vitroでDNA構築体を組み立てるために採用することが可能である。いくつかの態様においてDNA構築体は非プラスミド構築体であり、一方、他の態様においてそれはベクター（例えば、プラスミド）に組み込まれる。いくつかの態様において、環状プラスミドが用いられる。好ましい態様において、環状プラスミドは適切な制限酵素（すなわち、DNA構築体を分裂させない酵素）を用いるために設計される。しかし、直鎖状プラスミドもまた本発明において使用される（図1を参照されたい）。しかし、当該技術分野に既知の他の方法が本発明における使用に適切である（例えば、ペレゴ (Perego) 「バチルス・スプチルスにおける遺伝子操作のための組込みベクター」、ソネンシェイン (Sonenshein) 他編、『バチルス・スプチルスおよびその他グラム陽性菌』、アメリカン・ソサエティー・フォー・マイクロバイオロジー、ワシントンDC、[1993年]を参照されたい）。

【0141】

いくつかの態様において、外来配列は選択マーカを含む。いくつかの好ましい態様において、外来配列には染色体 *pckA* 遺伝子が含まれ、他方他の好ましい態様において外来配列には更に、*sbo*、*slr*、*ybcO*、*csn*、*spolISA*、*phrC*、*sigB*、*rapA*、*CssS*、*trpA*、*trpB*、*trpC*、*trpD*、*trpE*、*trpF*、*tdh/kbl*、*alsD*、*sigD*、*prpC*、*gapB*、*fbp*、*rocA*、*ycgN*、*ycgM*、*rocF*、および *rocD*、またはこれらの任意の遺伝子の断片（単独または組合わせた）からなる群から選択された染色体遺伝子が含まれる。追加的な態様において外来配列には相同 *pckA* 遺伝子配列が含まれ、一方、他の態様において外来配列には更に、*sbo*、*slr*、*ybcO*、*csn*、*spolISA*、*phrC*、*sigB*、*rapA*、*CssS*、*trpA*、*trpB*、*trpC*、*trpD*、*trpE*、*trpF*、*tdh/kbl*、*alsD*、*sigD*、*prpC*、*gapB*、*fbp*、*rocA*、*ycgN*、*ycgM*、*rocF*、および／または *rocD* 遺伝子配列からなる群から選択される少なくとも一つの追加的な相同配列が含まれる。相同配列は、外来配列に含まれることが可能な *sbo*、*slr*、*ybcO*、*csn*、*spolISA*、*phrC*、*sigB*、*rapA*、*CssS*、*trpA*、*trpB*、*trpC*、*trpD*、*trpE*、*trpF*、*tdh/kbl*、*alsD*、*sigD*、*prpC*、*gapB*、*pckA*、*fbp*、*rocA*、*ycgN*、*ycgM*、*rocF*、および *rocD* 遺伝子またはそれらの遺伝子断片と、少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、88%、85%、または 80% の配列同一性を有する核酸配列である。好ましい態様において、相同配列を含む外来配列は、*sbo*、*slr*、*ybcO*、*csn*、*spolISA*、*phrC*、*sigB*、*rapA*、*CssS*、*trpA*、*trpB*、*trpC*、*trpD*、*trpE*、*trpF*、*tdh/kbl*、*alsD*、*sigD*、*prpC*、*gapB*、*pckA*、*fbp*、*rocA*、*ycgN*、*ycgM*、*rocF*、または *rocD* 遺伝子またはこれら遺伝子の任意の遺伝子断片と少なくとも 95% の配列同一性を含む。更に他の態様において、前記外来配列は遺伝子配列の断片を有する 5' および 3' 末端に隣接する選択マーカを含む。いくつかの態様において、選択マーカおよび遺伝子、遺伝子断片またはそれとの相同配列を含む DNA 構築体が宿主細胞に形質転換される場合、選択マーカの位置が遺伝子をその意図された目的に対して機能しないようにする。いくつかの態様において、前記外来配列は遺伝子のプロモーター領域に位置する選択マーカを含む。他の態様において、前記外来配列は遺伝子のプロモーター領域の後ろに位置する選択マーカを含む。更に他の態様において、前記外来配列は遺伝子のコード領域に位置する選択マーカを含む。更なる態様において、前記外来配列は両末端におけるホモロジーボックスが隣接する選択マーカを含む。また更なる態様において、前記外来配列はコード配列の転写および／または翻訳を妨げる配列を含む。更に追加的な態様において、前記 DNA 構築体は、構築体の上流および末端で組換えられた制限部位を含む。

【0142】

前記 DNA 構築体はベクターに組み込まれても、またはプラスミド DNA の存在なしに用いられても、微生物の形質転換に用いられる。任意の形質転換に適切な方法は本発明に用いられると考えられる。好ましい態様において、前記 DNA 構築体の少なくとも一つのコピーが宿主バチルス染色体に組み込まれる。いくつかの態様において、本発明の 1 つ以上の DNA 構築体が宿主細胞の形質転換に用いられる。例えば、1 つの DNA 構築体は *slr* 遺伝子の不活性化に用いることができ、もう一つの構築体は *phrC* 遺伝子の不活性化に用いることができる。勿論、更なる組合わせが本発明によって考慮および提供される。

【0143】

いくつかの好ましい態様において、前記 DNA 構築体はまた、関心あるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。これらの好ましい態様のいくつかにおいて、前記 DNA 構築体にはまた、関心あるタンパク質をコードする配列と操作可能に結合する構成的または誘発的プロモーターが含まれる。関心あるタンパク質がプロテアーゼであるいくつか

の好ましい態様において、前記プロモーターは、*tac*プロモーター、*a β* -ラクタマーゼ・プロモーター、または*aprE*プロモーターからなる群より選択される（デボア（De Boer）他、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、80巻：21-25頁〔1983年〕）。しかし、このことは、当業者に既知の任意の適切なプロモーターが本発明での使用されるとき、本発明が任意の特定のプロモーターに限定されることを意図していない。それにも拘わらず、特定の好ましい態様において、前記プロモーターは*B. subtilis aprE*プロモーターである。

【0144】

バチルス種の形質転換に関して多くの方法が知られる。実際にプラスミド構築体およびプラスミドの大腸菌への形質転換を含むバチルスの染色体を改変する方法は、よく知られている。殆どの方法において、プラスミドは引き続き大腸菌から単離され、バチルスに形質転換される。しかし、大腸菌のような介在微生物を用いることは重要ではなく、いくつかの好ましい態様において、前記DNA構築体はコンピテント・バチルス宿主へ直接に形質転換される。

【0145】

いくつかの態様において、周知のバチルス・*B. subtilis*菌株168は本発明において使用される。実際、この菌株のゲノムは充分に特徴付けられてきた（クンスト（Kunst）他、*Nei*、390巻：249-256頁〔1997年〕、ヘンナー（Hennner）他、*Microbiol. Rev.*、44巻、57-82頁〔1980年〕を参照のされたい）。前記ゲノムは、一つの4215 kb染色体からなる。他方、本発明で用いられる配位は168菌株のことを言い、本発明にはバチルス菌株との類似配列が含まれる。

【0146】

いくつかの態様において、前記外来染色体配列は*pckA*遺伝子を含み、一方、代替的な態様において外来染色体配列には更に、*sbo*、*slr*、*ybcO*、*csn*、*spolISA*、*sigB*、*phrC*、*rapA*、*CssS*、*trpA*、*trpB*、*trpC*、*trpD*、*trpE*、*trpF*、*tdh/kbl*、*alsD*、*sigD*、*prpC*、*gapB*、*fbp*、*rocA*、*ycgN*、*ycgM*、*rocF*、および*rocD*遺伝子の断片およびそれらとの相同配列からなる群から選択される一つ以上の遺伝子が含まれる。*B. subtilis* 168由来のこれらの遺伝子のDNAコード配列は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号39、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号50、配列番号37、配列番号25、配列番号21、配列番号50、配列番号29、配列番号23、配列番号27、配列番号19、配列番号31、配列番号48、配列番号46、配列番号35、配列番号33において提供される。

【0147】

上述のように、いくつかの態様において、*pckA*を単独でまたは*sbo*、*slr*、*ybcO*、*csn*、*spolISA*、*sigB*、*phrC*、*rapA*、*CssS*、*trpA*、*trpB*、*trpC*、*trpD*、*trpE*、*trpF*、*tdh*、*kbl*、*alsD*、*sigD*、*prpC*、*gapB*、*fbp*、*rocA*、*ycgN*、*ycgM*、*rocF*、および*rocD*遺伝子、それらの遺伝子断片、またはそれらとの相同配列と*pckA*の組合わせを含む外来配列にはコード領域が含まれ、またさらに染色体コード領域に直に隣接する配列を含む。いくつかの態様において、コード領域に隣接する配列には、約1 bp~2500 kb、1 bp~1500 bp、約1 bp~1000 bp、約1 bp~500 bp、および1 bp~250 bpの範囲が含まれる。コード領域に隣接する配列を含む核酸配列の数は、遺伝子コード配列の各末端において異なってもよい。例えば、いくつかの態様において、コード配列の5'末端は25 bp未満を含み、コード配列の3'末端は100 bpより多く含む。これらの遺伝子および遺伝子産物は以下に示される。本発明で使用される番号付けは、*subtilist*（*subtilist*）において用いられているものである（モツァー（Moszer）他、*Microbiol.*、141巻、261-268頁〔1995年〕を参照されたい）。

10

20

30

40

50

【0148】

B. スブチルスの s b o コード配列を以下に示す。

【表 3】

ATGAAAAAAGCTGTCATTGTAGAAAACAAAGGTTGTGCAACATGCTCGATCGGAGCCG
CTTGTCTAGTGGACGGTCCTATCCCTGATTTTGAAATTGCCGGTGCAACAGGTCTATTC
GGTCTATGGGGG (SEQ ID NO:1).

【0149】

S b o の推定アミノ酸配列は、

【表 4】

MKKAVIVENKGCATCSIGAACLVDGPIPDFEIAGATGLFGLWG (SEQ ID NO: 2).

10

【0150】

ある態様において、B. スブチルス 168 染色体の約 3834868～3835219
b p において見出された遺伝子領域は、本発明を用いて欠失された。約 3835081～
3835209 において見出される s b o コード領域は、スブチリシン A、いくつかのグ
ラム陽性菌に対して活性を有する抗菌剤を生産する（チェング（Z h e n g）他、J. B
a c t e r i o l.、181 巻：7346～7355 頁 [1994 年] を参照されたい）

20

【0151】

B. スブチルス 168 の s l r コード配列を以下に示す。

【表 5】

ATGATTGGAAGAATTATCCGTTTGTACCGTAAAAGAAAAGGCTATTCTATTAATCAGCTG
GCTGTTGAGTCAGGCGTATCCAAATCCTATTTAAGCAAGATTGAAAGAGGCGTTACAC
GAATCCGTCCGTTCAATTTTTAAAAAAGTTTCTGCCCACTGGAAGTTGAATTAACAGA
ATTATTTGACGCAGAAACAATGATGTATGAAAAAATCAGCGGCGGTGAAGAAGAATGGC
GCGTACATTTAGTGCAAGCCGTACAAGCCGGGATGGAAAAGGAAGAATTGTTCACTTTT
ACGAACAGACTCAAGAAAGAACAGCCTGAACTGCCTCTTACCGCAACCGCAAACCTGA
CGGAATCCAATATAGAAGAATGGAAAGCGCTGATGGCGGAGGCAAGAGAAATCGGCTT
GTCTGTCCATGAAGTCAAATCCTTTTTAAAAACAAAGGGAAGA (SEQ ID NO:3).

30

【0152】

S l r の推定アミノ酸配列は、

【表 6】

MIGRIIRLYRKRKGYSINQLAVESGVSKSYLSKIERGVHTNPSVQFLKKVSATLEVELTELF
DAETMMYEKISGGEEWRVHLVQAVQAGMEKEELFTFTNRLKKEQPETASYRNRKLTES
NIEWKALMAEAREIGLSVHEVKSFLKTKGR (SEQ ID NO: 4).

40

【0153】

ある態様において、B. スブチルス 168 染色体の約 3529014～3529603
b p において見出された配列は、本発明を用いて欠失された。s l r コード配列は染色体
の約 3529131～3529586 において見出される。

【0154】

B. スブチルス 168 の p h c C コード配列を以下に示す。

【表 7】

ATGAAATTGAAATCTAAGTTGTTTGTATTGTTTGGCCGCAGCCGCGATTTTACAGCG
GCTGGCGTTTCTGCTAATGCGGAAGCACTCGACTTTCATGTGACAGAAAGAGGAATGA
CG (SEQ ID NO :13).

【0155】

P h r C の推定アミノ酸配列は、

【表 8】

MKLKSKLFVICLAAAAIFTAAGVVSANAEALDFHVTERGMT (SEQ ID NO: 14)

10

【0156】

更に、B. スブチルス168染色体の約429531～429650bpにおいて見出されるコード領域は、コード配列の429591における選択マーカの挿入によって不活性化された。

【0157】

B. スブチルス168のs i g Bコード配列を以下に示す。

【表 9】

TTGATCATGACACAACCATCAAAAACCTACGAACTAACTAAAGATGAAGTCGATCGGCT
CATAAGCGATTACCAAACAAAGCAAGATGAACAAGCGCAGGAAACGCTTGTGCGGGTG
TATACAAATCTGGTTGACATGCTTGCGAAAAAATACTCAAAGGCCAAAGCTTCCACGA
GGATCTCCGCCAGGTCGGCATGATCGGGCTGCTAGGCGCGATTAAGCGATACGATCC
TGTTGTGCGGCAAATCGTTTGAAGCTTTGCAATCCCGACAATCATCGGTGAAATTAAC
GTTTCCTCAGAGATAAACATGGAGCGTTCATGTGCCGAGACGAATTAAGAACTCGGT
CCAAGAATCAAATGGCGGTTGATCAGCTGACCACTGAAACACAAAGATCGCCGAAAG
TCGAAGAGATTGCCGAATTCCTCGATGTTTCTGAAGAAGAGGTTCTTGAAACGATGGAA
ATGGGCAAAGCTATCAAGCCTTATCCGTTGACCACAGCATTGAAGCGGATTCGGACG
GAAGCACTGTCACGATTCTTGATATCGTCGGATCACAGGAGGACGGATATGAGCGGGT
CAACCAGCAATTGATGCTGCAAAGCGTGCTTCATGTCCTTTCAGACCGTGAGAAACAAA
TCATAGACCTTACGTATATTCAAACAAAAGCCAAAAAGAACTGGGGACATTCTCGGT
ATATCTCAAATGCACGTCTCGCGCTTGCAACGCAAAGCTGTGAAGAAGCTCAGAGAGG
CCTTGATTGAAGATCCCTCGATGGAGTTAATG (SEQ ID NO:9).

20

30

【0158】

S i g B の推定アミノ酸配列は、

【表 10】

MIMTQPSKTTKLTKDEVDR LISDYQTKQDEQAQETLVRVYTNLVDMLAKKYSKGKSFHED
LRQVGMIGLLGAIKRYDPVVGKSFEAFIPTIIGEIKRFLRDKTWSVHVPRRIKELGPRIKMA
VDQLTTETQRSPKVEEIAEFLDVSEEEVLETMEMGKSYQALSVDHSIEADSDGSTVTILDI
VGSQEDGYERVNQQLMLQSVLHVLSDREKQIIDLTYIQNKSQKETGDILGISQMHVSRLQ
RKAVKKLREALIEDPSMELM (SEQ ID NO: 10).

40

【0159】

更に、コード配列はB. スブチルス168染色体の約522417～5232085bpにおいて見出される。

【0160】

B. スブチルス168のs p o l l S Aコード配列を以下に示す。

【表 1 1】

ATGGTTTTATTCTTTCAGATCATGGTCTGGTGCATCGTGGCCGGACTGGGGTTATACGT
GTATGCCACGTGGCGTTTCGAAGCGAAGGTCAAAGAAAAAATGTCCGCCATTTCGGAAA
ACTTGGTATTTGCTGTTTGTCTGGGCGCTATGGTATACTGGACATATGAGCCCACTTC
CCTATTTACCCACTGGGAACGGTATCTCATTGTGCGCAGTCAGTTTTGCTTTGATTGATG
CTTTTATCTTCTTAAGTGCATATGTCAAAAACTGGCCGGCAGCGAGCTTGAAACAGAC
ACAAGAGAAATTCTTGAAGAAAACAACGAAATGCTCCACATGTATCTCAATCGGCTGAA
AACATACCAATACCTATTGAAAAACGAACCGATCCATGTTTATTATGGAAGTATAGATGC
TTATGCTGAAGGTATTGATAAGCTGCTGAAAACCTATGCTGATAAAATGAACTTAACGG
CTTCTCTTTGCCACTATTGACACAGGCTGATAAAGACCGGTTAACCGAGCATATGGAT
GATCCGGCAGATGTACAAACACGGCTCGATCGAAAGGATGTTTATTACGACCAATACG
GAAAAGTGGTTCTCATCCCTTTTACCATCGAGACACAGAACTATGTCATCAAGCTGACG
TCTGACAGCATTGTCACGGAATTTGATTATTTGCTATTTACGTCATTAACGAGCATATAT
GATTTGGTGCTGCCAATTGAGGAGGAAGGTGAAGGA (SEQ ID NO:11).

10

【0 1 6 1】

s p o l l S A の推定アミノ酸配列は、

【表 1 2】

MVLFFQIMVWCIVAGLGLYVYATWRFEAKVKEKMSAIRKTYWLLFVLGAMVYWTYEPTSL
FTHWERYLIVAVSFALIDAFIFLSAYVKKLAGELETDREILEENNEMLHMYLNLRLKTYQY
LLKNEPIHVYVYGSIDAYAEGIDKLLKTYADKMNLTASLCHYSTQADKDRLTEHMDDPADV
QTRLDRKDVYDQYQKVLIPFTIETQNYVIKLTSDSIVTEFDYLLFTSLTSIYDLVLPIDEEG
EG (SEQ ID NO: 12).

20

【0 1 6 2】

更に、コード領域はB. スプチルス 1 6 8 染色体の約 1 3 4 7 5 8 7 ~ 1 3 4 8 7 1 4
b p において見出される。

【0 1 6 3】

B. スプチルス 1 6 8 の c s n コード配列を以下に示す。

【表 1 3】

ATGAAAATCAGTATGCAAAAAGCAGATTTTTGGAAAAAGCAGCGATCTCATTACTTGT
TTCACCATGTTTTTACCCTGATGATGAGCGAAACGGTTTTTTCGGCGGGACTGAATAA
AGATCAAAAGCGCCGGGCGGAACAGCTGACAAGTATCTTTGAAAACGGCACAACGGA
GATCCAATATGGATATGTAGAGCGATTGGATGACGGGCGAGGCTATACATGCGGACGG
GCAGGCTTTACAACGGCTACCGGGGATGCATTGGAAGTAGTGGAAGTATACACAAAGG
CAGTTCCGAATAACAACTGAAAAAGTATCTGCCTGAATTGCGCCGTCTGGCCAAGGA
AGAAAGCGATGATACAAGCAATCTCAAGGGATTGCTTCTGCCTGGAAGTCGCTTGCA
AATGATAAGGAATTTGCGCGCCGCTCAAGACAAAGTAAATGACCATTTGTATTATCAGCC
TGCCATGAAACGATCGGATAATGCCGGAATAAAAACAGCATTGGCAAGAGCTGTGATG
TACGATACGGTTATTCAGCATGGCGATGGTGATGACCCTGACTCTTTTTATGCCTTGAT
TAAACGTACGAACAAAAAGCGGGCGGATCACCTAAAGACGGAATAGACGAGAAGAAG
TGGTTGAATAAATTCTTGGACGTACGCTATGACGATCTGATGAATCCGGCCAATCATGA
CACCCGTGACGAATGGAGAGAATCAGTTGCCCGTGTGGACGTGCTTCGCTCTATCGCC
AAGGAGAACAATACTAAACGGACCGATTGATGTTGTTCAAACGAGTACGGTAA
TTTTGTAATCAA (SEQ ID NO:7).

30

40

【0 1 6 4】

C s n の推定アミノ酸配列は、

【表 1 4】

MKISMQKADFWKKAAISLLVFTMFFTLMMSETVFAAGLNKDQKRRAEQ LTSIFENGTT EIQ
 YGYVERLDDGRGYTCGRAGFTTATGDALEVVEVYTKAVPNNKLKKYLP ERLRAKEESD
 DTSNLKGFASAWKSLANDKEFRAAQDKVNDHLYYQPAMKRSDNAGLKTALARA VMYDT
 VIQHGDDGDDPDSFYALIKRTNKKAGGSPKDGIDEKKWLNKFLDVRYDDL MNPANHDTRD
 EWRESVARVDVLR SIAKENNYNLNGPIHVR SNEYGNFVIK (SEQ ID NO: 8).

【0 1 6 5】

更に、コード領域は B. スプチルス 1 6 8 染色体の約 2 7 4 7 2 1 3 ~ 2 7 4 8 0 4 3
 b p において見出される。

10

【0 1 6 6】

B. スプチルス 1 6 8 の y b c O コード配列を以下に示す。

【表 1 5】

ATGAAAAGAAACCAAAAAGAATGGGAATCTGTGAGTAAAAAAGGACTTATGAAGCCGG
 GAGGTACTTCGATTGTGAAAGCTGCTGGCTGCATGGGCTGTTGGGCCTCGAAGAGTAT
 TGCTATGACACGTGTTTGTGCACTCCGCATCCTGCTATGAGAGCTATT (SEQ ID NO:5).

【0 1 6 7】

Y b c O の推定アミノ酸配列は、

【表 1 6】

MKRNQKEWESVSKKGLMKPGGTSIVKAAGCMGCWASKSIAMTRVCALPHPAMRAI
 (SEQ ID NO: 6).

20

【0 1 6 8】

更に、コード領域は B. スプチルス 1 6 8 染色体の約 2 1 3 9 2 6 ~ 2 1 4 0 9 0 b p
 において見出される。

【0 1 6 9】

B. スプチルス 1 6 8 の r a p A コード配列を以下に示す。

【表 1 7】

TTGAGGATGAAGCAGACGATTCCGTCCTCTTATGTCTGGGCTTAAAATTAATGAATGGTA
 TACTCATATCCGGCAGTTCCACGTCGCTGAAGCCGAACGGGTCAAGCTCGAAGTAGAA
 AGAGAAATTGAGGATATGGAAGAAGACCAAGATTTGCTGCTGTATTATTCTTTAATGGA
 GTTCAGGCACCGTGTCATGCTGGATTACATTAAGCCTTTTGGAGAGGACACGTCGCAG
 CTAGAGTTTTT CAGAATTGTTAGAAGACATCGAAGGGAATCAGTACAAGCTGACAGGGCT
 TCTCGAATATTACTTTAATTTTTTTTCGAGGAATGTATGAATTTAAGCAGAAGATGTTTGTG
 AGTGCCATGATGTATTATAAACGGGCAGAAAAGAATCTTGCCCTCGTCTCGGATGATAT
 TGAGAAAGCAGAGTTTGGCTTTTAAAATGGCTGAGATTTTTTACAATTTAAAACAAACCTA
 TGTTTCGATGAGCTACGCCGTT CAGGCATTAGAAACATACCAAATGTATGAAACGTACA
 CCGTCCGCAGAAATCCAATGTGAATTCGTTATTGCAGGTAATTATGATGATATGCAGTAT
 CCAGAAAGAGCATTGCCCCACTTAGAACTGGCTTTAGATCTTGCAAAGAAAGAAGGCA
 ATCCCCGCCTGATCAGTTCTGCCCTATATAATCTCGGAAACTGCTATGAGAAAATGGGT
 GAACTGCAAAAGGCAGCCGAATACTTTGGGAAATCTGTTTCTATTTGCAAGTCGGAAAA
 GTTCGATAATCTTCCGCATTCTATCTACTCTTTAACACAAGTTCTGTATAAACAAAAAAT
 GACGCCGAAGCGCAAAAAAAGTATCGTGAAGGATTGGAATCGCCCGTCAATACAGTG
 ATGAATTATTTGTGGAGCTTTTTCAATTTTACATGCGTTATACGGAAAAAACATTGACA
 CAGAATCAGTCTCACACACCTTTCAATTTCTTGAAGAACATATGCTGTATCCTTATATTG
 AAGAGCTGGCGCATGATGCTGCCCAATTCTATATAGAAAACGGACAGCCCGAAAAAGC
 ACTTTCAATTTATGAGAAAATGGTGCACGCACAAAAACAAATCCAGAGAGGAGATTGTT
 TATATGAAATC (SEQ ID NO :15).

30

40

【0 1 7 0】

R a p A の推定アミノ酸配列は、

50

【表 18】

MRMKQTIPSSYVGLKINNEWYTHIRQFHVAEAERVKLEVEREIEDMEEDQDLLLLYYSLMEF
 RHRVMLDYIKPFGEDTSQLEFSELLEDIEGNQYKLTGLLEYFNFRRGMYEFKQKMFVSA
 MMYKRAEKNLALVSDIEKAFAFKMAEIFYNLKQTYVSMYSYAVQALETYQMYETYTVR
 RIQCEFVIAGNYDDMQYPERALPHLELALDLAKKEGNPRLISSALYNLGNCEYKMGELQK
 AAIFYGKSVSICKSEKFDNLPHSIYSLTQVLYKQKNDAAEAQKKYREGLEIARQYSDELFE
 LFQFLHALYGKNIDTESVSHTFQFLEEHLMPYIEELAHDAQAQFYIENGQPEKALSIFYEKM
 VHAQKQIQRGDCLYEI (SEQ ID NO: 16)

【0171】

更に、コード領域は B. スプチルス 168 染色体の約 1315179 ~ 1316312
 bp において見出される。

【0172】

B. スプチルス 168 の C s s コード配列を以下に示す。

【表 19】

ATGAAAAACAAGCCGCTCGCGTTTCAGATATGGGTTGTCATATCCGGCATCCTGTTAG
 CGATATCGATTTTACTGCTTGTGTTATTTTCAAACACGCTGCGAGATTTTTTCACTAAT
 GAAACGTATACGACGATTGAAAATGAGCAGCATGTTCTGACAGAGTACCGCCTGCCA
 GGTTGATTGAAAGGCGCTATTACAGCGAGGAAGCGACGGCGCCGACAACGTCCG
 CTCCGTACAGCACGTGCTCCTTCCTGAAAATGAAGAGGCTTCTTCAGACAAGGATTTA
 AGCATTCTGTCATCTTCATTTATCCACAAGGTGTACAAGCTGGCTGATAAGCAGGAAG
 CTAAGGAAAGAAACGTTACAGCGCCGACGTCAATGGAGAGAAAGTGTTTTTGTCAATTA
 AAAGGGACTTTCCGTCAATGGACAATCAGCGATGATGCTCTCTTACGCGCTTGATTCT
 TATCGGGACGATTTGGCCTATACCTTGTCAAACAGCTTCTGTTTATTATAGCTGTCGT
 CATTTTATTAAGCTGGATTCCGGCTATTTGGCTTGCAAAGTATTTATCAAGGCCTCTTG
 TATCATTTGAAAAACACGTCAAACCGGATTTCTGAACAGGATTGGGATGACCCAGTAAA
 AGTGGACCGGAAAGATGAAATCGGCAAATTGGGCCATACCATCGAAGAGATGCGCC
 AAAAGCTTGTGCAAAAGGATGAAACAGAAAGAACTCTATTGCAAAATATCTCTCATGA
 TTTAAAAACGCCGGTCATGGTCATCAGAGGCTATACACAATCAATTAAGACGGGATT
 TTTCTAAAGGAGACCTTGAAAACACTGTAGATGTTATTGAATGCGAAGCTCTTAAGC
 TGGAGAAAAAAATAAAGGATTTATTATATTTAACGAAGCTGGATTATTTAGCGAAGCAA
 AAAGTGACGACGACATGTTTCAAGTATTGTGGAAGTGACAGAAGAAGTCATCGAACGA
 TTGAAGTGGGCGCGGAAAGAACTATCGTGGGAAATTGATGTAGAAGAGGATATTTTG
 ATGCCGGGCGATCCGGAGCAATGGAACAACTCCTCGAAAACATTTTGAAAATCAA
 ATCCGCTATGCTGAGACAAAAATAGAAATCAGCATGAAACAAGATGATCGAAATATCG
 TGATCACCATTAAAAATGACGGTCCGCATATTGAAGATGAGATGCTCTCCAGCCTCTA
 TGAGCCTTTTAATAAAGGGAAGAAAGGCGAATTCCGGCATTGGTCTAAGCATCGTAAAA
 CGAATTTTAAGTCTTTCATAAGGCATCTATCTCAATTGAAAATGACAAAACGGGTGTATC
 ATACCGCATAGCAGTGCCAAAA (SEQ ID NO:17).

【0173】

C s s の推定アミノ酸配列 (ジェンバンク (GenBank) アクセス番号 03219
 3) は、

【表 20】

MKNKPLAFQI WVISGILLAISILLLVLSNTRLRDFFTNETYTTIENEQHVLTETRLPGSIE
 RRYSEEATAPTTVRSVQ HVLLPENEEASSDKDLSILS SSFIHKVYKLADKQEAKKR
 YSADVNGEKVFFVIKKGLSVNGQSAMMLSYALDSYRDDLAYTLFKQLLFIIAVILLSWIPAI
 WLAKYLSRPLVSFEKHVKRISEQDWDDPVKVDKDEIGKLGHTIEEMRQKLVQKDETER
 TLLQNISHDLKTPVMVIRGYTQSIKDGIFPKGDLENTVDVIECEALKLEKKIKDLLYLTKLDY
 LAKQKVQHDMFSIVEVTEEVIERLKWARKELSWEIVEEDILMPGDPEQWNKLLNILENQI
 RYAETKIEISMKQDDRNIVITIKNDGPHIEDEMLSSLYEPFNKGKKGEFGIGLSIVKRILTLHK
 ASISIENDKTGVSYRIAVPK (SEQ ID NO:18).

【0174】

更に、コード領域はB. スプチルス168染色体の約3384612～3386774 bpにおいて見出される。

【0175】

B. スプチルス168のFbpタンパク（フルクトース-1, 6-バイオフォスファターゼ）のfbpコード配列を以下に示す。

【表21】

```
ATGTTTAAAAATAATGTCATACTTTTAAATTCACCTTATCATGCACATGCTCATAAAGA
GGGGTTTATTCTAAAAAGGGGATGGACGGTTTTTGAAAGCAAGTACCTAGATCTACT
CGCACAAAAATACGATTGTGAAGAAAAAGTGGTAACAGAAATCATCAATTTGAAAGCG
ATATTGAACCTGCCAAAAGGCACCGAGCATTTTGTCAAGTATCTGCACGGAGAGTAT
CAGGCATTCCAGCACGTGTTGCGCAATGGTTCAGGACGAGTCAAAGAGAAGATACG
CGACATCTTCAGCGGTGTCAATTTACGATAGAGAAATTGATGAATTAGCAGCATTGGTC
TATTATCCGGAAGACAAACTGAAATTAATCAAACATGACTTTGATGCGAAAGAAGCGT
TAAACGAGTGGTATAAAGAAACGATTCATCGAATGATTAAGCTCGTTTCATATTGCTC
CTCTAAGTATACCCGCTCCAAATTACGCAAAGCACTGCCTGCCCAATTTGCTTATATT
ACGGAGGAGCTGTTATACAAAACAGAACAAAGCTGGCAACAAGGAGCAATATTACTCC
GAAATCATTGATCAGATCATTGAACTTGGCCAAGCCGATAAGCTGATCACCGGCCTT
GCTTACAGCGTTCAGCGATTGGTGGTCGACCATCTGCATGTGGTCGGCGATATTTAT
GACCGCGGCCCGCAGCCGGATAGAATTATGGAAGAACTGATCAACTATCATTCTGTC
GATATTCAGTGGGGAAATCACGATGTCCTTTGGATCGGCGCCTATTCGCGTTCCAAA
GTGTGCCTGGCCAATATTATCCGCATCTGTGCCCGCTACGACAACCTGGATATTATTG
AGGACGTGTACGGCATCAACCTGAGACCGCTGCTGAACCTGGCCGAAAAATATTATG
ATGATAATCCAGCGTTCCGTCCAAAAGCAGACGAAACAGGCCAGAGGATGAGATTA
AGCAAATCACAAAAATCCATCAAGCGATTGCCATGATCCAATTCAAGCTTGAGAGCCC
GATTATCAAGAGACGGCCGAACTTTAATATGGAAGAGCGGCTGTTATTAGAGAAAATA
GACTATGACAAAAATGAAATCACGCTGAACGGAAAAACATATCAACTGGAAAAACACCT
GCTTTGCGACGATTAATCCGGAGCAGCCAGATCAGCTATTAGAAGAAGAAGCAGAAG
TCATAGACAAGCTGCTATTCTCTGTCCAGCATTCCGAAAAGCTGGGCCGCCATATGA
ATTTTATGATGAAAAAAGGCAGCCTTTATTTAAAATATAACGGCAACCTGTTGATTCAC
GGCTGTATTCCAGTTGATGAAAACGGCAATATGGAAACGATGATGATTGAGGATAAA
CCGTATGCGGGCCGTGAGCTGCTCGATGTATTTGAACGATTCTTGCGGGAAGCCTTT
GCCCACCCGGAAGAAACCGATGACCTGGCGACAGATATGGCTTGGTATTTATGGACA
GGCGAATACTCCTCCCTCTTCGGAACGCGCCATGACGACATTTGAGCGCTATTTT
ATCAAAGAGAAGGAAACGCATAAAGAGAAGAAAAACCCGTATTATTATTTACGAGAAG
ACGAGGCAACCTGCCGAAACATCCTGGCAGAATTCGGCCTCAATCCAGATCACGGC
CATATCATCAACGGCCATACACCTGTAAAAGAAATCGAAGGAGAAGACCCAATCAAA
GCAAACGGAAAAATGATCGTCATCGACGGCGGCTTCTCAAAGCCTACCAATCCACA
ACAGGCATCGCCGGCTACACGCTGCTATACAACTCCTACGGCATGCAGCTCGTCGC
CCATAAACACTTCAATTCCAAGGCAGAAGTCCTAAGCACCGGAACCGACGTCTTAAC
GGTCAAACGATTAGTGGACAAAGAGCTTGAGCGGAAGAAAGTGAAGGAAACGAATGT
GGGTGAGGAATTGTTGCAGGAAGTTGCGATTTTAGAGAGTTTGCGGGAGTATCGGTA
TATGAAG (SEQ ID NO:19).
```

10

20

30

40

【0176】

Fbpタンパクの推定アミノ酸配列は、

【表 2 2】

MFKNNVILLNSPYHAHAHKEGFILKRGWTVLESKYLDLLAQKYDCEEKVVTEIINLKAILNL
 PKGTEHFVSDLHGEYQAFQHVLNRNGSGRVKEKIRDIFSGVIYDREIDELAALVYYPED
 KLKLIKHDFAKEALNEWYKETIHRMIKLVSYCSSKYTRSKLRKALPAQFAYITEELLYK
 TEQAGNKEQYYSEIIDQIIELGQADKLITGLAYSVQRLVVDHLHVVGDIYDRGPQPDRI
 EELINYHSVDIQWGNHDVLWIGAYSGSKVCLANIIRICARYDNLDIIEDVYGINLRPLL
 LAEKYYDDNPAFRPKADENRPEDEIKQITKIHQAIAIMIQFKLESPIIKRRPNFNMEERLL
 LEKIDYDKNEITLNGKTYQLENTCFATINPEQPDQLLEEEAEVIDKLLFSVQHSEKLGRH
 MNFMMKKGSLYLKYNGNLLIHGCIQVDENGNMETMMIEDKPYAGRELLDVFERFLREAF
 AHPEETDDLATDMAWYLWTGEYSSLFGKRAMTTFFERYFIKEKETHKEKNPYYYLREDE
 ATCRNLAIEFGLNPDHGHIIINGHTPVKEIEGEDPIKANGKMIVIDGGFSKAYQSTTGIAGYT
 LLYNSYGMQLVAHKHFNNSKAEVLSTGTDVLTVKRLVDKELERKKVKETNVGEELLQEVAI
 LESLREYRYMK (SEQ ID NO:20).

10

【0 1 7 7】

更に、コード領域はB. スブチルス 1 6 8 染色体の約 4 1 2 7 0 5 3 ~ 4 1 2 9 0 6 5
 b p において見出される。

【0 1 7 8】

B. スブチルス 1 6 8 の a l s D タンパク (アルファアセト乳酸デカルボキシラーゼ
) の a l s D コード配列を以下に示す。

20

【表 2 3】

ATGAAACGAGAAAGCAACATTCAAGTGCTCAGCCGTGGTCAAAAAGATCAGCCTGTG
 AGCCAGATTTATCAAGTATCAACAATGACTTCTCTATTAGACGGAGTATATGACGGAG
 ATTTTGAAGTGTGAGAGATTCCGAAATATGGAGACTTCGGTATCGGAACCTTTAACAA
 GCTTGACGGAGAGCTGATTGGGTTTGACGGCGAATTTTACCGTCTTCGCTCAGACGG
 AACCGCGACACCGGTCCAAAATGGAGACCGTTACCGTCTCTGTTCAATTACGTTCTTT
 ACACCGGACATGACGCACAAAATTGATGCGAAAATGACACGCGAAGACTTTGAAAAA
 GAGATCAACAGCATGCTGCCAAGCAGAACTTATTTTATGCAATTCGCATTGACGGAT
 TGTTTAAAAGGTGCAGACAAGAACAGTAGAACTTCAAGAAAAACCTTACGTGCCAAT
 GGTTGAAGCGGTCAAAACACAGCCGATTTTCAACTTCGACAACGTGAGAGGAACGAT
 TGTAGGTTTCTTGACACCAGCTTATGCAAACGGAATCGCCGTTTCTGGCTATCACCTG
 CACTTCATTGACGAAGGACGCAATTCAGGCGGACACGTTTTTACTATGTGCTTGAG
 GATTGCACGGTTACGATTTCTCAAAAAATGAACATGAATCTCAGACTTCCGAACACAG
 CGGATTTCTTTAATGCGAATCTGGATAACCCTGATTTTGCGAAAGATATCGAAACAAC
 TGAAGGAAGCCCTGAA (SEQ ID NO:21).

30

【0 1 7 9】

A l s D タンパクの推定アミノ酸配列は、

【表 2 4】

MKRESNIQVLSRGQKDQPVSQIYQVSTMTSLLDGVYDGDSEIPKYGDFGIGTFNKLD
 GELIGFDGEFYRLRSDGTATPVQNGDRSPFCSTFFFTPDMTHKIDAKMTREDFEKEINSM
 LPSRNLFYAIRIDGLFKKVQTRTVELQEKPYPVPMVEAVKTQPIFNFDNVRGTIVGFLTPAYA
 NGIAVSGYHLHFIDEGRNSGGHVFDYVLEDCTVTISQKMNMNLRNPNTADFFNANLDNPD
 FAKDIETTEGSPE (SEQ ID NO:22).

40

【0 1 8 0】

更に、コード領域はB. スブチルス 1 6 8 染色体の約 3 7 0 7 8 2 9 ~ 3 7 0 8 5 9 3
 b p において見出される。

【0 1 8 1】

B. スブチルス 1 6 8 の g a p B タンパク (グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロ
 ゲナーゼ) の g a p B コード配列を以下に示す。

50

【表 2 5】

ATGAAGGTAAAAGTAGCGATCAACGGGTTTGAAGAATCGGAAGAATGGTTTTTAGA
 AAAGCGATGTTAGACGATCAAATTCAGTAGTGGCCATTAAACGCCAGCTATCCGCA
 GAAACGCTGGCTCATTTAATAAAGTATGACACAATTCACGGCAGATACGACAAAGAG
 GTTGTGGCTGGTGAAGATAGCCTGATCGTAAATGGAAAGAAAGTGCTTTTGTAAACA
 GCCGTGATCCAAAACAGCTGCCTTGGCGGGAATATGATATTGACATAGTCGTGGAAG
 CAACAGGGAAGTTTAATGCTAAAGATAAAGCGATGGGCCATATAGAAGCAGGTGCAA
 AAAAAAGTGATTTTGACCGCTCCGGGAAAAAATGAAGACGTTACCATTGTGATGGGCG
 TAAATGAGGACCAATTCGACGCTGAGCGCCATGTCATTATTTCAAATGCGTCATGCAC
 GACAAATTGCCTTGCGCCTGTTGTAAAAGTGCTGGATGAAGAGTTTGGCATTGAGAG
 CGGTCTGATGACTACAGTTCATGCGTATACGAATGACCAAAAAAATATTGATAACCCG
 CACAAAGATTTGCGCCGGGCGCGGGCTTGCGGTGAATCCATCATTCCAACAACAACA
 GGAGCGGCAAAGGCGCTTTGCGCTTGCTGCCGCATCTGAAAGGAAAACTTCACGG
 CCTCGCCTTGCGTGTCCCTGTTCCGAACGTCTCATTGGTTGATCTCGTTGTTGATCTG
 AAAACGGATGTTACGGCTGAAGAAGTAAACGAGGCATTTAAACGCGCTGCCAAAACG
 TCGATGTACGGTGTACTTGATTACTCAGATGAACCGCTCGTTTCGACTGATTATAATA
 CGAATCCGCATTCAGCGGTGATTGACGGGCTTACAACAATGGTAATGGAAGACAGGA
 AAGTAAAGGTGCTGGCGTGGTATGACAACGAATGGGGCTACTCCTGCAGAGTTGTTG
 ATCTAATCCGCCATGTAGCGGCACGAATGAAACATCCGTCTGCTGTA (SEQ ID
 NO:23).

10

20

【0 1 8 2】

G a p B タンパクの推定アミノ酸配列は、

【表 2 6】

MKVKVAINGFGRIGRMVFRKAMLDQIQVVAINASYS AETLAHLIKYDTIHGRYDKEVVA
 GEDSLIVNGKKVLLLNSRDPKQLPWREYDIDIVVEATGKFNAKDKAMGHIEAGAKKVILT
 APGKNEDVTIVMGVNEDQFDAERHVIISNASCTTNCLAPVVKVLDEEFGIESGLMTTVHAY
 TNDQKNIDNPHKDLRRARACGESIIPTTTTGAAKALSLVPLHLKGKLHGLALRVPVPNVSLV
 DLVVDLKTDTVTAEEVNEAFKRAAKTSMYGVLDYSDEPLVSTDYNTNPHSAVIDGLTTMVM
 EDRKVKVLAWYDNEWGYSCRVDLIRHVAARMKHPSAV (SEQ ID NO:24).

30

【0 1 8 3】

更に、コード領域はB. スプチルス168染色体の約2966075～2967094
 bpにおいて見出される。

【0 1 8 4】

K b l タンパク (2-アミノ-3-ケトブツレートC o A リガーゼ) のK b l コード配
 列を以下に示す。

【表 2 7】

ATGACGAAGGAATTTGAGTTTTTAAAAGCAGAGCTTAATAGTATGAAAGAAAACCAT
 CATGGCAAGACATAAAACAGCTTGAATCTATGCAGGGCCCCTCTGTACAGTGAATC
 ACCAAAAAGTCATTCAGCTATCTTCTAATAATTACCTCGGATTCACTTCACATCCTAGA
 CTCATCAACGCCGCACAGGAGGCCGTTGAGCAGTATGGAGCCGGCACCGGATCAGT
 GAGAACGATTGCGGGTACATTTACAATGCATCAAGAGCTTGAGAAAAAGCTGGCAGC
 CTTTAAAAAACGGAGGCGGCACTTGTATTCCAATCAGGCTTCACAACAAACCAAGG
 CGTACTTTCAAGTATTCTATCAAAAGAGGACATTGTCTCATCTCAGATGAATTGAACCAT
 GCCTCTATTATTGACGGAATTGCACTGACAAAGGCGGATAAAAAGGTGTATCAGCAC
 GTCAATATGAGTGATTTAGAGCGGGTGCTGAGAAAGTCAATGAATTATCGGATGCGT
 CTGATTGTGACAGACGGCGTATTTTCCATGGATGGCAACATAGCTCCTCTGCCTGATA
 TTGTAGAGCTCGCTGAGAAATATGACGCATTTGTGATGGTGGATGACGCCCATGCAT
 CCGGAGTACTTGGCGAAAACGGCAGGGGAACGGTGAATCACTTCGGTCTTGACGGC
 AGAGTGCATATTCAGGTCGGAACATTAAGCAAGGCAATCGGAGTGCTCGGCGGCTA
 CGCTGCAGGTTCAAAGGTGCTGATCGATTATTTGCGCCATAAAGGCCGTCCATTTTAA
 TTCAGCACATCTCATCCGCCCGGCAGTCACTGCAGCTTGTATGGAAGCGATTGATGTC
 TTGCTTGAAGAGCCGGAGCATATGGAGCGCTTGTGGGAGAATACTGCCTATTTTAAA
 GCAATGCTTGTGAAAATGGGTCTGACTCTCACGAAGAGTGAAACGCCGATTCTTCT
 ATTTTAATAGGTGATGAAGGTGTGGCAAAGCAATTTTCAGATCAGCTCCTTTCTCGCG
 GTGTTTTTGCCCAAAGTATCGTTTTCCCGACTGTAGCAAAGGGAAAAGCCAGAATTG
 CACGATTATAACAGCAGAGCACACCAAAGATGAACTGGATCAGGCGCTTGATGTCAT
 CGAAAAGACGGCAAAGGAGCTCCAGCTATTG (SEQ ID NO:25).

10

20

【0 1 8 5】

K b 1 タンパクの推定アミノ酸配列は、

【表 2 8】

MTKEFEFLKAELNSMKENHTWQDIKQLESMQGPSVTNVNHQKVIQLSSNNYLGFTSHPRLI
 NAAQEAVQQYGAGTGSVRTIAGTFTMHQELEKKLAAFKKTEAALVFQSGFTTNQGVLSI
 LSKEDIVISDELNHASIIDGIRLTKADKKVYQHVNMSDLERVLRKSMNYRMRLIVTDGVFS
 MDGNIAPLPDIVELAKEYDAFVMVDDAHASGVLGENGRGTNVNHFGLDGRVHIQVGTLSK
 AIGVLGGYAAGSKVLIDYLRHKGRPFLFSTSHPPAVTAACMEAIDVLLEEPEHMERLWEN
 TAYFKAMLVKMGLTLTKSETPILPILIGDEGVAKQFSDQLLSRGVFAQSIVFPTVAKGKARI
 RTIITAETHKDELQALDVIEKTAKELQLL (SEQ ID NO:26).

30

【0 1 8 6】

更に、コード領域はB. スブチルス168染色体の約1770787～1771962
 bpにおいて見出される。

【0 1 8 7】

B. スブチルス168のpckAタンパク（フォスフォエノルピルベート カルボキシ
 キナーゼ）のpckAコード配列を以下に示す。

【表 2 9】

ATGAACTCAGTTGATTTGACCGCTGATTTACAAGCCTTATTAACATGTCCAAATGTGC
 GTCATAATTTATCAGCAGCACAGCTAACAGAAAAAGTCCTCTCCCGAAACGAAGGCAT
 TTTAACATCCACAGGTGCTGTTTCGCGCGACAACAGGCGCTTACACAGGACGCTCACC
 TAAAGATAAATTCATCGTGGAGGAAGAAAGCACGAAAAATAAGATCGATTGGGGCCC
 GGTGAATCAGCCGATTTT CAGAAGAAGCGTTTGAGCGGCTGTACACGAAAGTTGTCAG
 CTATTTAAAGGAGCGAGATGAACTGTTTGTTCGAAGGATTTGCCGGAGCAGACGA
 GAAATACAGGCTGCCGATCACTGTCGTAAATGAGTTCGCATGGCACAATTTATTTGCG
 CGGCAGCTGTTTATCCGTCCGGAAGGAAATGATAAGAAAACAGTTGAGCAGCCGTTT
 ACCATTCTTTCTGCTCCGCATTTCAAAGCGGATCCAAAAACAGACGGCACTCATTCCG
 AAACGTTTATTATTGTCTCTTTTCGAAAAGCGGACAATTTTAATCGGCGGAACTGAGTA
 TGCCGGTGAAATGAAGAAGTCCATTTTCTCCATTATGAATTTCTGCTGCCTGAAAGA
 GATATTTTATCTATGCACTGCTCCGCCAATGTCGGTGAAAAAGGCGATGTCGCCCTTT
 TCTTCGGACTGTCAGGAACAGGAAAGACCACCCTGTCGGCAGATGCTGACCGCAAG
 CTGATCGGTGACGATGAACATGGCTGGTCTGATACAGGCGTCTTTAATATTGAAGGC
 GGATGCTACGCTAAGTGTATTCATTTAAGCGAGGAAAAGGAGCCGCAAATCTTTAAC
 GCGATCCGCTTCGGGTCTGTTCTCGAAAATGTCGTTGTGGATGAAGATACACGCGAA
 GCCAATTATGATGATTCCTTCTATACTGAAAACACGCGGGCAGCTTACCCGATTCATA
 TGATTAATAACATCGTGA CTCCAAGCATGGCCGGCCATCCGTCAGCCATTGTATTTTT
 GACGGCTGATGCCTTCGGAGTCCTGCCGCCGATCAGCAAATAACGAAGGAGCAGG
 TGATGTACCATTTTTTTGAGCGGTTACACGAGTAAGCTTGCCGGAACCGAACGTGGTG
 TCACGTCTCCTGAAACGACGTTTTCTACATGCTTCGGCTCACCGTTCTGCGCTTCC
 TGCTCACGTCTATGCTGAAATGCTCGGCAAAAAGATCGATGAACACGGCGCAGACGT
 TTTCTTAGTCAATACCGGATGGACCGGGGGCGGCTACGGCACAGGCGAACGAATGA
 AGCTTTCTTACACTAGAGCAATGGTCAAAGCAGCGATTGAAGGCAAATTAGAGGATG
 CTGAAATGATAACTGACGATATTTTCGGCCTGCACATTCCGGCCCATGTTCTGCGGT
 TCCTGATCATATCCTTCAGCCTGAAAACACGTGGACCAACAAGGAAGAATACAAAGAA
 AAAGCAGTCTACCTTGCAAATGAATCAAAGAGAACTTTAAAAAGTTGCGACATACCG
 ATGCCATCGCCCAGGCAGGCGGCCCTCTCGTA (SEQ ID NO:27).

10

20

【0188】

p c k A タンパクの推定アミノ酸配列は、

【表 3 0】

MNSVDLTADLQALLTCPNVRHNL SAAQLTEKVL SRNEGILTSTGAVRATTGAYTGRSPKD
 KFIVEEESTKNKIDWGPVNQPISEEA FERLYTKVVSYLKERDEL FVFEGFAGADEKYRLPI
 TVVNEFAWHNLFARQLFIRPEGNDKKTVEQPFTILSAPHFKADPKTDGTHSETFIIVSF
 EKRTILIGGTEYAGEMKKSIFSIMN FLLPERDILSMHCSANVGEKGDVALFFGLSGTGKT
 TLSADADRKLIGDDEHGWSDTG VFNIEGGCYAKCIHLSEEKEPQIFNAIRFGSVLENVVV
 DEDTREANYDDSFYTENTRAAYPIHMINNIVTPSMAGHPSAIVFLTADAFGVLPPI SKLT
 KEQVMYHFLSGYTSKLAGTERGV TSPETTFSTCFGSPFLPLPAHVYAEMLGKKIDEHGAD
 VFLVNTGWTGGGYGTGERMKLSYTRAMV KAAIEGKLEDAEMITDDIFGLHIPAHVPGVPD
 HILQPENTWTNKEEYKEKAVYLANEFKENFKKFAHTDAIAQAGGPLV (SEQ ID NO:28).

40

【0189】

更に、コード領域は B. スプチルス 168 染色体の約 3128579 ~ 3130159 bp において見出される。

【0190】

B. スプチルス 168 の p r p C タンパク (プロテイン フォスファターゼ) の p r p C コード配列を以下に示す。

【表 3 1】

TTGTTAACAGCCTTAAAAACAGATACAGGAAAAATCCGCCAGCATAATGAAGATGATG
 CGGGGATATTCAAGGGGAAAGATGAATTTATATTAGCGGTTGTCGCTGATGGCATGG
 GCGGCCATCTTGCTGGAGATGTTGCGAGCAAGATGGCTGTGAAAGCCATGGGGGAG
 AAATGGAATGAAGCAGAGACGATTCCAACCTGCGCCCTCGGAATGTGAAAAATGGCTC
 ATTGAACAGATTCTATCGGTAAACAGCAAAATATACGATCACGCTCAAGCCCACGAAG
 AATGCCAAGGCATGGGGACGACGATTGTATGTGCACTTTTTACGGGGAAAAACGGTTT
 CTGTTGCCCATATCGGAGACAGCAGATGCTATTTGCTTCAGGACGATGATTTTCGTTCA
 AGTGACAGAAGACCATTGCTTGTAATGAACTGGTTCGCACTGGAGAGATTTCCAG
 AGAAGACGCTGAACATCATCCGCGAAAAAATGTGTTGACGAAGGCGCTTGGAACAGA
 CCAGTTAGTCAGTATTGACACCCGTTCCCTTTGATATAGAACCCGGAGACAAACTGCTT
 CTATGTTCTGACGGACTGACAAATAAAGTGGAAGGCACTGAGTTAAAAGACATCCTG
 CAAAGCGATTCAGCTCCTCAGGAAAAAGTAAACCTGCTTGTGGACAAAGCCAATCAG
 AATGGCGGAGAAGACAACATTACAGCAGTTTTGCTTGAGCTTGCTTTACAAGTTGAAG
 AGGGTGAAGATCAGTGC (SEQ ID NO:29).

10

【0 1 9 1】

p r p C タンパクの推定アミノ酸配列は、

【表 3 2】

MLTALKTDTGKIRQHNEDDAGIFKGKDEFILAVVADGMGGHLAGDVASKMAVKAMGEKW
 NEAETIPTAPSECEKWLIEQILSVNSKIYDHAQAHEECQGMGTTIVCALFTGKTVSVAHIG
 DSRCYLLQDDDFVQVTEHDHSLVNLVVRTGEISREDAEHHPRKNVLTALGTDQLVSIDTR
 SFDIEPGDKLLLCSDGLTNKVEGTELKDILQSDSAPQEKVNLLVDKANQNGGEDNITAVLL
 ELALQVEEGEDQC (SEQ ID NO:30).

20

【0 1 9 2】

更に、コード領域は B. スブチルス 1 6 8 染色体の約 1 6 4 9 6 8 4 ~ 1 6 5 0 4 4 5
 b p において見出される。

【0 1 9 3】

B. スブチルス 1 6 8 の r o c A タンパク (プロリンー 5 カルボキレート デハイド
 ロゲナーゼ) の r o c A コード配列を以下に示す。 30

【表 3 3】

ATGACAGTCACATACGCGCACGAACCATTTACCGATTTTACGGAAGCAAAGAATAAAA
 CTGCATTTGGGGAGTCATTGGCCTTTGTAAACACTCAGCTCGGCAAGCATTATCCGC
 TTGTCATAAATGGAGAAAAAATTGAAACGCGACCGCAAATCATTCTATTAACCCGGC
 AAATAAAGAAGAGATCATTGGGTACGCGTCTACAGCGGATCAAGAGCTTGCTGAAAA
 AGCGATGCAAGCCGCATTGCAGGCATTTGATTCTTGAAAAAACAAGACCGGAGCA
 CCGCGCAAATATTCTCTTTAAGGCAGCGGCTATTTTGCAGCAAGAAAGCATGAATTT
 TCAAGCTATCTTGTGAAGGAAGCAGGAAAACCGTGGAAGGAAGCAGATGCGGACAC
 GGCTGAAGCGATAGACTTTTTAGAGTTCTACGCGCGCCAAATGTTAAAGCTCAAGGA
 AGGGGCTCCGGTGAAGAGCCGTGCTGGCGAGGTCAATCAATATCATTACGAAGCGC
 TTGGCGTCGGCATCGTCATTTCTCCATTTAACTTCCCGCTCGCGATTATGGCGGGAA
 CAGCGGTGGCAGCGATTGTGACAGGAAATACGATTCTCTTAAACCGGCTGACGCAG
 CCCCAGTAGTGGCAGCAAAATTTGTGAGGTGATGGAGGAAGCGGGTCTGCCAAAC
 GGCGTTCTGAATTACATTCCGGGAGATGGTGCGGAGATCGGTGATTTCTTAGTTGAG
 CATCCGAAGACACGGTTTGTCTCATTTACAGGTTCCCGTGCAAGTCGGCTGCCGGATT
 TATGAGCGAGCTGCCAAAGTGACAGCCGGGCCAAAAATGGCTCAAACGGGTAATTGC
 AGAAATGGGCGGAAAAGACACAGTGCTTGTGACAAGGACGCTGATCTTGACCTTGC
 TGCATCCTCTATCGTGTATTGAGCATTTGGATATTCAGGACAGAAGTGTTCTGCGGGC
 TCCCGCGCGGTCAATCATCAGGATGTGTATGATGAAGTGGTGGAAAAAGCTGTGGCG
 CTGACCAAACGCTGACTGTGCGCAATCCAGAAGATCCTGATACGTATATGGGTCCC
 GTGATTCATGAAGCATCCTACAACAAAGTGATGAAATACATTGAAATCGGCAAATCTG
 AAGGCAAGCTATTGGCCGGCGGAGAAGGCGATGATTCAAAGGCTACTTTATTCAGC
 CGACGATCTTTGCAGATGTTGATGAAAACGCCCGCTTGATGCAGGAAGAAATTTTCG
 GCCCGGTTGTTGCGATTTGCAAAGCGCGTGATTTGATCATATGCTGGAGATTGCCA
 ATAACACGGAATACGGATTAACAGGTGCGCTTCTGACGAAAAACCGTGCGCACATTG
 AACGGGCGCGGAGGATTTCCATGTGCGAAACCTATATTTAACAGAGGATGTACCG
 GAGCAATTGTCGGCTATCAGCCGTTCCGGCGGTTTTAATATGTCAGGAACAGACTCAA
 AAGCAGGCGGTCCCATTACTTAATTCTTCATATGCAAGCCAAAACAACGTCCGAAG
 CTTTT (SEQ ID NO:31).

10

20

【0194】

R o c A タンパクの推定アミノ酸配列は、

【表 3 4】

MTVTYAHEPFTDFTEAKNKTAFGESLAFVNTQLGKHYPVINGEKIETDRKIISINPANK
 EEIIGYASTADQELAEKAMQAALQAFDSWKKQRPEHRANILFKAAAILRRRKHEFSSYL
 KEAGKPWKEADADTAEAIDFLEFYARQMLKLKEGAPVKSRAGEVNQYHYEALGVGIVISP
 FNFPLAIMAGTAVAAIVTGNITLLKPADAAPVVAKFVEVMEEAGLPNGVLNYIPGDGAEIG
 DFLVEHPKTRFVSFTGSRAVGCRIYERAAKVQPGQKWLKRVAEMGGKDTVLDKDAL
 DLAASSIVYSAFGYSGQKCSAGSRAVIHQDVYDEVVEKAVALTKTLTVGNPEDPDYMG
 PVIHEASYNKVMKYIEIGKSEGKLLAGGEGDDSKGYFIQPTIFADV DENARLMQEEIFGPV
 VAICKARDFDHMLEIANNTYGLTGALLTKNRAHIERAREDFHVG NLYFNRGCTGAIVGY
 QPFGGFNMSGTDSKAGGPDYLILHMQAKTTSEAF (SEQ ID NO:32).

30

【0195】

更に、コード領域はB. スブチルス168染色体の約3877991~3879535 bpにおいて見出される。

40

【0196】

B. スブチルス168のrocDタンパク(オルニチン アミノトランスフェラーゼ)のrocDコード配列を以下に示す。

【表 3 5】

ATGACAGCTTTATCTAAATCCAAAGAAATTATTGATCAGACGTCTCATTACGGAGCCA
 ACAATTATCACCCGCTCCCGATTGTTATTTCTGAAGCGCTGGGTGCTTGGGTAAAGG
 ACCCGGAAGGCAATGAATATATGGATATGCTGAGTGCTTACTCTGCGGTAAACCAGG
 GGCACAGACACCCGAAAATCATTGAGGCATTAAAGGATCAGGCTGATAAAATCACCC
 TCACGTACGCGCGTTTCATAACGATCAGCTTGGGCCGTTTTACGAAAAACAGCTAA
 ACTGACAGGCCAAAGAGATGATTCTGCCGATGAATACAGGAGCCGAAGCGGTTGAATC
 CGCGGTGAAAGCGGCGAGACGCTGGGCGTATGAAGTGAAGGGCGTAGCTGACAAT
 CAAGCGGAAATTATCGCATGTGTGCGGGAACCTCCACGGCCGCACGATGCTGGCGGT
 ATCTCTTTCTTCTGAAGAGGAATATAAACGAGGATTCGGCCCGATGCTTCCAGGAATC
 AACTCATTCTTACGGCGATGTGGAAGCGCTTCGACAGGCCATTACGCCGAATACA
 GCGGCATTCTTGTGTTGAACCGATTCAAGGCGAAGCGGGCATTGTGATTCCGCCTGAA
 GGATTTTACAGGAAGCGGCGGCGATTGTGTAAGGAAGAGAATGTCTTGTGTTATTGCG
 GATGAAATTCAGACGGGTCTCGGACGTACAGGCAAGACGTTTGCCTGTGACTGGGA
 CGGCATTGTTCCGGATATGTATATCTTGGGCAAAGCGCTTGGCGGCGGTGTGTTCCC
 GATCTCTTGCATTGCGGCGGACCGCGAGATCCTAGGCGTGTTTAACCTGGCTCACA
 CGGCTCAACATTTGGTGGAACCCGCTTGCATGTGCAGTGTCTATCGCTTCATTAGAA
 GTGCTGGAGGATGAAAAGCTGGCGGATCGTTCTTGAACCTGGTGAATACTTTAAA
 AGCGAGCTTGAGAGTATTGACAGCCCTGTCATTAAAGAAGTCCGCGGCAGAGGGCT
 GTTTATCGGTGTGGAATTGACTGAAGCGGCACGTCCGTATTGTGAGCGTTTGAAGGA
 AGAGGGACTTTTATGCAAGGAAACGCATGATACAGTCATTGTTTTGCACCGCCATTA
 ATCATTTCCAAAGAGGACTTGGATTGGGCGATAGAGAAAATTAAGCACGTGCTGCGA
 AACGCA (SEQ ID NO:33).

10

20

【0197】

R o c D タンパクの推定アミノ酸配列は、

【表 3 6】

MTALSKSKEIIDQTSHYGANNYHPLPIVISEALGAWVKDPEGNEYMDMLSAYSAVNQGHR
 HPKIIQALKDQADKITLTSRAFHNDQLGPFYEKAKLTGKEMILPMNTGAEAVESAVKAAR
 RWAYEVKGVADNQAIEIACVGNFHHGRTMLAVSLSSSEEEYKRGFGPMLPGIKLIPYGDVEA
 LRQAITPNTAAFLFEPIQGEAGIVIPPEGFLQEAAAICKEENVLFIADIEIQTGLGRTGK
 TFACDWDGIVPDMYILGKALGGGVFPISCIAADREILGVFNPGSHGSTFGGNPLACAVSI
 ASLEVLEDEKLADRSLELGEYFKSELESIDSPVIKEVRGRGLFIGVELTEAARPYCERLK
 EEGLLCKETHDTVIRFAPPLIISKEDLDWAIEKIKHVL RNA (SEQ ID NO:34).

30

【0198】

更に、コード領域はB. スプチルス168染色体の約443328～4144530bpにおいて見出される。

【0199】

B. スプチルス168のrocFタンパク（アルギナーゼ）のrocDコード配列を以下に示す。

【表 3 7】

ATGGATAAAACGATTTTCGGTTATTGGAATGCCAATGGATTTAGGACAAGCACGACGC
 GGAGTGGATATGGGCCCCGAGTGCCATCCGGTACGCTCATCTGATCGAGAGGCTGTC
 AGACATGGGGTATACGGTTGAAGATCTCGGTGACATTCCGATCAATCGCGAAAAAAT
 CAAAAATGACGAGGAAGTCAACAAAGTCATTGAAGAGAAAAAATTCCCGCTTGTCTGGGCGG
 CGCGCAAAAGGTCAACAAAGTCATTGAAGAGAAAAAATTCCCGCTTGTCTGGGCGG
 TGACCACAGTATTGCGATCGGCACGCTTGACAGGCACAGCGAAGCATTACGATAATCT
 CGGCGTCATCTGGTATGACGCGCACGGCGATTTGAATACACTTGAAACTTCACCATC
 GGGCAATATTCACGGCATGCCGCTCGCGGTGAGCCTAGGCATTGGCCACGAGTCAC
 TGGTTAACCTTGAAGGCTACGCGCCTAAAATCAAACCGGAAAACGTCGTCATCATTG
 GCGCCCCGGTCACTTGATGAAGGGGAGCGCAAGTACATTAAGGAAAGCGGCATGAAG
 GTGTACACAATGCACGAAATCGATCGTCTTGGCATGACAAAGGTCATTGAAGAAACC
 CTTGATTATTTATCAGCATGTGATGGCGTCCATCTGAGCCTTGATCTGGACGGACTTG
 ATCCGAACGACGCACCGGGTGTGCGGAACCCCTGTGTCGCGCGGCATCAGCTACCGG
 GAGAGCCATTTGGCTATGGAAATGCTGTATGACGCAGGCATCATTACCTCAGCCGAA
 TTCGTTGAGGTTAACCCGATCCTTGATCACAAAAACAAAACGGGCAAAACAGCAGTA
 GAGCTCGTAGAATCCCTGTTAGGGAAGAAGCTGCTG (SEQ ID NO:35).

10

【0200】

R o c F タンパクの推定アミノ酸配列は、

【表 3 8】

MDKTISVIGMPMDLGQARRGVDMGPSAIRYAH LIERLSDMGYTVEDLGDIPINREKIKND
 EELKNLNSVLAGNEKLAQKVNKVIEEKKFPLVLGGDHSIAIGTLAGTAKHYDNLGVIWYD
 AHGDLNTLETSPSGNIHGMP LAVSLGIGHESLVNLEGYAPKIKPEN VVIIGARSLDEGER
 KYIKESGMKVYTMHEIDRLGMTKVIEETLDYLSACDGVHLSLDLDGLDPNDAPGVGTPVV
 GGISYRESHLAMEMLYDAGIITSAEFVEVNPILDHKNKTGKTAVELVESLLGKKLL (SEQ ID
 NO:36).

20

【0201】

更に、コード領域はB. スブチルス168染色体の約4140738～4141625
 bpにおいて見出される。

30

【0202】

B. スブチルス168のTdhタンパク(スレオニン 3-デハイドロゲナーゼ)のT
 dhコード配列を以下に示す。

【表 3 9】

ATGCAGAGTGGAAAGATGAAAGCTCTAATGAAAAAGGACGGGGCGTTCCGGTGCTGT
 GCTGACTGAAGTTCCCATTCCTGAGATTGATAAACATGAAGTCCTCATAAAAGTGAAA
 GCCGCTTCCATATGCCGCACGGATGTCCACATTTATAATTGGGATCAATGGGCACGT
 CAGAGAATCAAAACACCCTATGTTTTCGGCCATGAGTTCAGCGGCATCGTAGAGGGC
 GTGGGAGAGAATGTCAGCAGTGTAAGTGGGAGAGTATGTGTCTGCGGAAACACA
 CATTGTCTGTGGTGAATGTGTCCCTTGCCTAACAGGAAAATCTCATGTGTGTACCAAT
 ACTGCTATAATCGGAGTGGACACGGCAGGCTGTTTTGCGGAGTATGTAAAAGTTCCA
 GCTGATAACATTTGGAGAAATCCCGCTGATATGGACCCGTCGATTGCTTCCATTCAAG
 AGCCTTTAGGAAATGCAGTTCATACCGTACTCGAGAGCCAGCCTGCAGGAGGAACGA
 CTGCAGTCATTGGATGCGGACCGATTGGTCTTATGGCTGTTGCGGTTGCAAAAGCAG
 CAGGAGCTTCTCAGGTGATAGCGATTGATAAGAATGAATACAGGCTGAGGCTTGCAA
 AACAAATGGGAGCGACTTGTACTGTTTCTATTGAAAAAGAAGACCCGCTCAAAATTGT
 AAGCGCTTTAACGAGTGGAGAAGGAGCAGATCTTGTGTGTGAGATGTCGGGCCATCC
 CTCAGCGATTGCCCAAGGTCTTGCGATGGCTGCGAATGGCGGAAGATTTTCATATTCT
 CAGCTTGCCGGAACATCCGGTGACAATTGATTTGACGAATAAAGTGGTATTTAAAGG
 GCTTACCATCCAAGGAATCACAGGAAGAAAAATGTTTTCAACATGGCGCCAGGTGTC
 TCAGTTGATCAGTTCAAACATGATCGATCTTGACCTGTTATTACCCATCAGTTTCCAT
 TAGAGGAGTTTGAAAAAGGTTTCGAACTGATGAGAAGCGGGCAGTGCGGAAAAGTAA
 TTTTAATTCCA (SEQ ID NO:37).

10

【0 2 0 3】

T d h タンパクの推定アミノ酸配列は、

20

【表 4 0】

MQSGKMKALMKKDGAFGAVLTEVPIPEIDKHEVLIKVKAASICGTDVHIYNWDQWARQRI
 KTPYVFGHEFSGIVEGVGENVSSVKVGEYVSAETHIVCGECVPCLTGKSHVCTNTAIGV
 DTAGCFAEYVKVPADNIWRNPADMDPASIASIQEPLGNAVHTVLESQPAGGTTAVIGCGPI
 GLMAVAVAKAAGASQVIAIDKNEYRLRLAKQMGATCTVSIEKEDPLKIVSALTSGEGADLV
 CEMSGHPSAIAQGLAMAANGGRFHILSLPEHPVTIDLTNKVVFKGLTIQGITGRKMFSTW
 RQVSQLISSNMIDLAPVITHQFPLEEFKGFELMRSGQCGKVILIP (SEQ ID NO:38).

30

【0 2 0 4】

更に、コード領域はB. スプチルス168染色体の約1769731～1770771
 bpにおいて見出される。

【0 2 0 5】

トリプトファンオペロン制御領域および遺伝子 *trpE* (配列番号48)、*trpD* (配列番号46)、*trpC* (配列番号44)、*trpF* (配列番号50)、*trpB* (配列番号42)、および *trpA* (配列番号40) のコード配列を以下に示す。オペロン制御領域に下線を引いた。*trpE* 発端 (ATG) は、*trpD*、*trpC*、*trpF*、*trpB*、および *trpA* 発端 (これらもまた、表示順に太字で示す) と同様に太字で示す。

40

【0 2 0 6】

【表 4 1】

TAATACGATAAGAACAGCTTAGAAATACACAAGAGTGTGTATAAAGCAATTAGAATGA
 GTTGAGTTAGAGAATAGGGTAGCAGAGAATGAGTTTAGTTGAGCTGAGACATTATGTT
 TATTCTACCCAAAAGAAGTCTTTCTTTGGGTTTATTTGTTATATAGTATTTTATCCTCT
 CATGCCATCTTCTCATTCTCCTTGCCATAAGGAGTGAGAGCAATGAATTTCCAATCAA
 ACATTTCCGCATTTTTAGAGGACAGCTTGTCACCACACGATACCGATTGTGGAGAC
 CTTACAGTCGATACACTGACACCCATTCAAATGATAGAGAAGCTTGACAGGGAGATT
 ACGTATCTTCTTGAAGCAAGGACGATACATCCACTTGGTCCAGATATTCGTTTATCG
 GCCTGAATCCATTTCTCACAATTAAGAAGAGCAGGGCCGTTTTTCGGCCGCTGATC
 AGGACAGCAAATCTCTTTACACAGGAAATGAACTAAAAGAAGTGCTGAACTGGATGAA
 TACCACATACAAAATCAAAACACCTGAGCTTGGCATTCTTTTTGTCGGCGGAGCTGTC
 GGGTACTTAAGCTATGATATGATCCCGCTGATTGAGCCTTCTGTTCTTCGCATACCA
 AAGAAACAGACATGGAAAAGTGATGCTGTTTGTTCGGGACATTAATTGCGTATGA
 TCATGAAACCAAAAACGTCCACTTTATCCAATATGCAAGGCTCACTGGAGAGGAAACA
 AAAAACGAAAAAATGGATGTATTCCATCAAATCATCTGGAGCTTCAAAATCTCATTGA
 AAAATGATGGACCAAAAAACATAAAAGAGCTGTTTCTTTCTGCTGATTCATACAAGA
 CACCCAGCTTTGAGACAGTATCTTCTAATTATGAAAAATCGGCTTTTATGGCTGATGTA
 GAAAAATCAAAAGCTATATAAAAGCAGGCGATATCTTCAGGGTGTTTTATCACAAA
 AATTTGAGGTGCCGATAAAAGCAGATGCTTTTGAGTTATACCGAGTGCTTAGGATCGT
 CAATCCTTCGCCGTATATGTATTATATGAACTGCTAGACAGAGAAATAGTCGGCAGC
 TCTCCGGAACGGTTAATACACGTTCAAGACGGGCACTTAGAAATCCATCCGATTGCC
 GGTACGAGAAAACGCGGTGCAGACAAAGCTGAAGATGAGAGACTGAAGGTTGAGCT
 CATGAAGGATGAAAAAGAAAAAGCAGGAGCATTACATGCTCGTTGATCTTGCCGAAA
 CGATATCGGCAGAGTAGCAGAGTATGGTTCTGTTTCTGTGCCGGAGTTCAAAAAAT
 TGTTTCTTTTACATGTCATGCACATTATCTCGGTGGTTACAGGCCGATTGAAAAAA
 GGGGTTTCCTGTGCGATGCACTGATGTCTGCTTTCCCGGCCGGGGACTTTAACAGGC
 GCACCCAAAATCCGTGCCATGCAGCTTTTGCAAGAACTCGAGCCAACACCGAGAGAG
 ACATACGGAGGGTGATTGCCTACATTGGGTTTGACGGGAATATCGACTCTTGATTA
 CGATTGCGACGATGAGTGTAAGAACGGTGTTGCATCGATACAGGCAGGTGCTGGC
 ATTGTTGCTGATTCTGTTCCGGAAGCCGAATACGAAGAAAGCTGTAATAAAGCCGGT
 GCGCTGCTGAAAACGATTCATATTGCAGAAGACATGTTTCATAGCAAGGAGGATAAA
 GCTGATGAACAGATTTCTACAATTGTGCGTTGACGGGAAAAACCCTTACTGCCGGTGA
 GGCTGAAACGCTGATGAATATGATGATGGCAGCGGAAATGACTCCTTCTGAAATGGG
 GGGGATATTGTCAATTCTTGCTCATCGGGGGGAGACGCCAGAAGAGCTTGCGGGTT
 TTGTGAAGGCAATGCGGGGCACACGCTCTTACAGTCGATGGACTTCCTGATATTGTTG
 ATACATGCGGAACAGGGGGAGACGGTATTTCCACTTTTAATATCTCAACGGCCTCGG
 CAATTGTTGCCTCGGCAGCTGGTGCGAAAATCGCTAAGCATGGCAATCGCTCTGTCT
 CTTCTAAAAGCGGAAGCGCTGATGTTTTAGAGGAGCTAGAGGTTTCTATTCAAACCAC
 TCCCGAAAAGGTCAAAGCAGCATTGAAACAAACAACATGGGATTTCTTTTTGCGCCG
 CTTTACCATTCTGCTATGAAACATGTAGCAGGTACTAGAAAAGAGCTAGGTTTCAGAA
 CGGTATTTAATCTGCTTGGGCCGCTCAGCAATCCTTTACAGGCGAAGCGTCAGGTGA
 TTGGGGTCTATTCTGTTGAAAAAGCTGGACTGATGGCAAGCGCACTGGAGACGTTTC
 AGCCGAAGCACGTTATGTTTGTATCAAGCCGTGACGGTTTAGATGAGCTTCAATTAC
 AGCACCGACCGACGTGATTGAATTAAGGACGGAGAGCGCCGGGAGTATACCGTTT
 CACCCGAAGATTTCTGGTTTCACAAATGGCAGACTTGAAGATTTACAGGTGCAGTCTCC
 GAAAGAGAGCGCTTATCTCATTGAGAATATTTTTGAAAATAAAAGCAGCAGTTCCGCT
 TTATCTATTACGGCTTTTAATGCGGGTGCTGCGATTTACACGGCGGGAATTACCGCCT
 CACTGAAGGAAGGAACGGAGCTGGCGTTAGAGACGATTACAAGCGGAGGCGCTGCC
 GCGCAGCTTGAACGACTAAAGCAGAAAGAGGAAGAGATCTATGCTTGAAAAAATCAT
 CAAACAAAAGAAAGAAGAAGTGAAAACACTGGTTCTGCCGGTAGAGCAGCCTTTCGA
 GAAACGTTCAATTAAGGAGGCGCCGGCAAGCCCGAATCGGTTTATCGGGTTGATTGC
 CGAAGTGAAGAAAGCATCGCCGTCAAAGGGCTTATTAAGAGGATTTTGTACCTGT
 GCAGATTGCAAAAGACTATGAGGCTGCGAAGGCAGATGCGATTTCCGTTTTAACAGA
 CACCCCGTTTTTTCAAGGGGAAAACAGCTATTTATCAGACGTAAAGCGTGCTGTTTCG
 ATTCCTGTACTTAGAAAAGATTTTATTATTGATTCTCTTCAAGTAGAGGAATCAAGAAG

10

20

30

40

【表 4 2】

AATCGGAGCGGATGCCATATTGTTAATCGGCGAGGTGCTTGATCCCTTACACCTTCAT
GAATTATATCTTGAAGCAGGTGAAAAGGGGATGGACGTGTTAGTGGAGGTTTCATGAT
GCATCAACGCTAGAACAAATATTGAAAGTGTTACACCCGACATTCTCGGCGTAAATA
ATCGAAACCTAAAAACGTTTGAAACATCTGTAAAGCAGACAGAACAATCGCATCTCT
CGTTCCGAAAGAATCCTTGCTTGTCAGCGAAAGCGGAATCGGTTCTTTAGAACATTTA
ACATTTGTCAATGAACATGGGGCGCGAGCTGTACTTATCGGTGAATCATTGATGAGA
CAAACCTTCAGCGTAAAGCAATCCATGCTTTGTTTAGGGAGTGAGGTTGTGAAGAAA
CCGGCATTAAAAATTGCGGTATTCGGTCACTAAAGGATTTGCAGCTTGGCGCGGAA
TCACAGGCTGATTACCTAGGATTTATTTTTGCTGAAAGCAAACGAAAAGTATCTCCGG
AAGATGTGAAAAAATGGCTGAACCAAGTTCGTGTCGAAAAACAGGTTGCAGGTGTTTT
TGTTAATGAATCAATAGAGACGATGTCACGTATTGCCAAGAGCTTGAAGCTCGACGTC
ATTCAGCTTCACGGTGATGAAAAACCGGCGGATGTCGCTGCTCTTCGCAAGCTGACA
GGCTGTGAAATATGGAAGGCGCTTCACCATCAAGATAACACAACCTCAAGAAATAGCC
CGCTTTAAAGATAATGTTGACGGCTTTGTGATTGATTTCATCTGTAAAAGGGTCTAGAG
GCGGAACTGGTGTTCATTTTCTGGGACTGTGTGCCGGAATATCAGCAGGCGGCTA
TTGGTAAACGCTGCTTTATCGCTGGCGGCGTGAATCCGGATAGCATCACACGCCTAT
TGAAATGGCAGCCAGAAGGAATTGACCTTGCCAGCGGAATTGAAAAAACGGACAAA
AAGATCAGAATCTGATGAGGCTTTTAGAAGAAAGGATGAACCGATATGTATCCATATC
CGAATGAAATAGGCAGATACGGTGATTTTGGCGGAAAGTTTGTTCGGGAAACACTCA
TGCAGCCGTTAGATGAAATACAAACAGCATTTAAACAAATCAAGGATGATCCCGCTTT
TCGTGAAGAGTATTATAAGCTGTTAAAGGACTATTCCGGACGCCCGACTGCATTAACA
TACGCTGATCGAGTCACTGAATACTTAGGCGGCGCGAAAATCTATTTGAAACGAGAA
GATTTAAACCATACAGGTTCTCATAAAATCAATAATGCGCTAGGTCAAGCGCTGCTTG
CTAAAAAATGGGCAAAACGAAAATCATTGCTGAAACCGGTGCCGGCCAGCATGGTG
TTGCCGCTGCAACAGTTGCAGCCAAATTCGGCTTTTCTGTACTGTGTTTATGGGTGA
AGAGGATGTTGCCCGCCAGTCTCTGAACGTTTTCCGCATGAAGCTTCTTGAGCGGA
GGTAGTGCCTGTAACAAGCGGAAACGGAACATTGAAGGATGCCACAAATGAGGCGA
TCCGGTACTGGGTTTCAGCATTGTGAGGATCACTTTTATATGATTGGATCAGTTGTCCG
CCCGCATCCTTATCCGCAAGTGGTCCGTGAATTTCAAAAAATGATCGGAGAGGAAGC
GAAGGATCAGTTGAAACGTATTGAAGGCACTATGCCTGATAAAGTAGTGGCATGTGT
AGGCGGAGGAAGCAATGCGATGGGTATGTTTCAGGCATTTTTAAATGAAGATGTTGA
ACTGATCGGCGCTGAAGCAGCAGGAAAAGGAATTGATACACCTCTTCATGCCGCCAC
TATTTTCGAAAGGAACCGTAGGGGTTATTCACGGTTCATTGACTTATCTCATTGAGGAT
GAGTTCGGGCAAATTATTGAGCCCTACTCTATTTACGCCGGTCTCGACTATCCTGGAA
TCGGTCCGGAGCATGCATATTTGCATAAAAGCGGCCGTGTCACTTATGACAGTATAA
CCGATGAAGAAGCGGTGGATGCATTAAGCTTTTGTGAGAAAAAGAGGGGATTTTGC
CGGCAATCGAATCTGCCCATGCGTTAGCGAAAGCATTCAAACCTGCCAAAGGAATGG
ATCGCGGTCAACTCATTCTCGTCTGTTTATCAGGCGGGGAGACAAGGATGTCAACA
CATTAATGAATGTATTGGAAGAAGAGGTGAAAGCCCATGTTTAAATTGGATCTTCAAC
CATCAGAAAAATTGTTTATCCCGTTTATTACGGCGGGCGATCCAGTTCCTGAGGTTTC
GATTGAACTGGCGAAGTCACTCCAAAAAGCAGGCGCCACAGCATTGGAGCTTGGTGT
TGCATACTCTGACCCGCTTGACAGACGGTCCGGTGATCCAGCGGGCTTCAAAGCGGG
CGCTTGATCAAGGAATGAATATCGTAAAGGCAATCGAATTAGGCGGAGAAATGAAAA
AAACGGAGTGAATATTCCGATTATCCTCTTTACGTATTATAATCCTGTGTTACAATTG
AACAAAGAATACTTTTTCGCTTTACTGCGGGAAAATCATATTGACGGTCTGCTTGTTT
CGGATCTGCCATTAGAAGAAAGCAACAGCCTTCAAGAGGAATGTAAAAGCCATGAGG
TGACGTATATTTCTTTAGTTGCGCCGACAAGCGAAAGCCGTTTGAAGAACATTATTGA
ACAAGCCGAGGGGTTCTGTCTACTGTGTATCTTCTCTGGGTGTGACCGGTGTCCGCAA
TGAGTTCAATTCATCCGTGTACCGTTTCATTCTGTACTGTGAAGAATCTCAGCACTGTT
CCGGTTGCTGTAGGGTTCCGGTATATCAAACCGTGAACAGGTCATAAAGATGAATGAA
ATTAGTGACGGTGTGCTAGTGGAAGTGCGCTCGTCAGAAAAATAGAAGAATTAAAG
GACCGGCTCATCAGCGCTGAAACGAGAAATCAGGCGCTGCAGGAGTTTGAGGATTA
TGCAATGGCGTTTAGCGGCTTGACAGTTTAAAA (SEQ ID NO:39).

10

20

30

40

T r p Aタンパク（トリプトファン合成酵素（アルファサブユニット））の推定配列は、

【表 4 3】

MFKLDLQPSEKLFIPFITAGDPVPEVSIELAKSLQKAGATALELGVAYSDDLADGPVIQR
ASKRALDQGMNIVKAIELGGEMKKNGVNIPIILFTYYNPVLQLNKEYFFALLRENHIDGL
LVPDLPLEESNSLQEECKSHEVTYISLVAPTSESRLKTIEQAEGFVYCVSSLGVTGVRN
EFNSSVYPFIRTVKNLSTVPVAVGFGISNREQVIKMNEISDGVVVGSAALVRKIEELKDRL
ISAETRNQALQEFEDYAMAFSGLYSLK (SEQ ID NO:41).

【0 2 0 9】

10

T r p Bタンパク（トリプトファン合成酵素（ベータサブユニット））の推定配列は、

【表 4 4】

MYPYPNEIGRYGDFGGKFVPETLMQPLDEIQTAFKQIKDDPAFREEYYKLLKDYSGRPTA
LTYADRVTEYLGGAKIYLLKREDLNHTGSHKINNALGQALLAKKMGKTKIIAETGAGQHGA
AATVAAKFGFSCVTFMGEEDVARQSLNVFRMKLLGAEVVPVTSNGNTLKDATNEAIRYW
VQHCEHDFYMGISVVGPHYPYQVVREFQKMIGEEAKDQLKRIEGTMPDKVVACVGGGS
NAMGMFQAFLNEDVELIGAEAAGKGIDTPLHAATISKGTGVGVIHGSPTYLIQDEFGQIIEPY
SISAGLDYPGIGPEHAYLHKSGRVTYDSITDEEAVDALKLLSEKEGILPAIESAHALAKAFKL
AKGMDRGQLILVCLSGRGDKDVNTLMNVLEEEVKAHV (SEQ ID NO:43).

20

【0 2 1 0】

T r p Cタンパク（インドール-3-グルセロールリン酸シンターゼ）の推定配列は、

【表 4 5】

MLEKIIKQKKEEVKTLVLPVEQPFKEKRSFKEAPASPNRFIGLIAEVKKASPSKGLIKEDF
VPVQIAKDYEAAKADAISVLTDTPTFFQGENSYLSDVKRAVSIPVLRKDFIIDSLQVEESR
RIGADAILLIGEVLDPHLHLELYLEAGEKGMVDLVVHDASTLEQILKVFTPDILGVNNR
NLKTFETSVKQTEQIASLVPKESLLVSESGIGSLEHLTFVNEHGARAVALIGESLMRQTSQ
RKAIHALFRE (SEQ ID NO:45).

【0 2 1 1】

30

T r p Dタンパク（アントラニル酸フォスフォリボスルトランスフェラーゼ）の推定配列は、

【表 4 6】

MNRFLQLCVDGKTLTAGEAETLMNMMMAAEMTPSEMGGILSILAHHRGETPEELAGFVKA
MRAHALTVDGLPDIVDTCTGTTGGDGISTFNISTASAIVASAAGAKIAKHGNRSVSSKSGSAD
VLEELEVSIQTTPEKVKSSIETNNMGFLFAPLYHSSMKHVAGTRKELGFRTVFNLLGPLSN
PLQAKRQVIGVYSVEKAGLMASALETFQPKHVMFVSSRDGLDELSITAPTDVIELKDGER
REYTVSPEDFGFTNGRLEDLQVQSPKESAYLIQNIFENKSSSSALSITAFNAGAAIYTAGIT
ASLKEGTELALETITSGGAAAQLERLKQKEEEIYA (SEQ ID NO:47).

40

【0 2 1 2】

T r p Eタンパク（アントラニル酸シンターゼ）の配列は、

【表 4 7】

MNFQSNISAFLEDSLSHHTIPIVETFTVDTLTPIQMIEKLDREITYLLESKDDTSTWSRY
 SFIGNLPFLTKEEQGRFSAADQDSKSLYTGNELKEVLNWMNTTYKIKTPELGIPFVGGA
 VGYLSDYMIPLIEPSVPSHTKETDMEKCMFLVCRTLIAYDHETKNVHFIQYARLTGEETK
 NEKMDVFHQNHLELQNLIEKMMDQKNIKELFLSADSYKTPSFETVSSNYEKSAFMADVEK
 IKSIIKAGDIFQGVLSQKFEVPIKADAFELYRVLRIVNPSPYMYMKLLDREIVGSSPERLIH
 VQDGHLEIHPIAGTRKRGADKAEDERLKVLMKDEKEKAEHYMLVDLARNDIGRVAEYGG
 SVSVPEFTKIVSFSHVMHIISVVTGRLKKGVPVDALMSAFPAGTLTGAPKIRAMQLLQEL
 EPTPRETYGGCIAYIGFDGNIDSCITIRTMVSKNGVASIQAGAGIVADSVPEAEYEESCNKA
 GALLKTIHIAEDMFHSHKEDKADEQISTIVR (SEQ ID NO:49).

10

【0 2 1 3】

T r p F タンパク (ホスホリボシル・アトラニル酸イソメラーゼ) の推定配列は、

【表 4 8】

MKKPALKYCGIRSLKDLQLAAESQADYLGFIKAEKRVSPEDVKKWLNQVRVEKQVAG
 VFNESIETMSRIAKSLKLDVIQLHGDEKPADVAALRKLTGCEIWKALHHQDNTTQEIAF
 KDNVDGFVIDSSVKGSRGGTGVAFSWDCVPEYQQAIGKRCFIAGGVNPDSITRLLKWQ
 PEGIDLASGIEKNGQKDQNLMLLEERMNRYVSISE (SEQ ID NO:51).

【0 2 1 4】

更に、コード領域は B. スプチルス 1 6 8 染色体の約 2 3 7 0 7 0 7 ~ 2 3 7 6 8 3 4
 b p (第一 b p = 2 3 7 6 8 3 4、最終 b p = 2 3 7 0 7 0 7) において見出される。

【0 2 1 5】

B. スプチルス 1 6 8 の y c g M タンパク (プロリン酸化酵素に類似) の y c d M コー
 ド配列を以下に示す。

【表 4 9】

GTGATCACAAGAGATTTTTCTTATTTTTATCCAAAAGCGGCTTTCTCAATAAAATGGC
 GAGGAAGTGGGGAAGTCGGGTAGCAGCGGGTAAAATTATCGGCGGGAATGACTTTA
 ACAGTTCAATCCCGACCATTCGACAGCTTAACAGCCAAGGCTTGTCAGTTACTGTGCA
 TCATTTAGGCGAGTTTGTGAACAGCGCCGAGGTCGCACGGGAGCGTACGGAAGAGT
 GCATTCAAACCATTCGACCATCGCGGATCAGGAGCTGAACCTCACACGTTTCTTTAAA
 AATGACGTCTTTAGGTTTGGATATAGATATGGATTTGGTGTATGAAAATATGACAAAAA
 TCCTTCAGACGGCCGAGAAACATAAAATCATGGTCACCATGACATGGAGGACGAAG
 TCAGATGCCAGAAAACGCTTGATATTTCAAAGATTTGAGAAAGAAATACGAGCATGT
 GAGCACAGTGCTGCAAGCCTATCTGTACCGGACGGAAAAAGACATTGACGATTTGGA
 TTCTTTAAACCCGTTCTTCGCTTGTAAGGAGCTTATAAAGAATCAGAAAAAGTA
 GCTTTCCCGGAGAAAAGCGATGTCGATGAAAATTACAAAAAATCATCCGAAAGCAG
 CTCTTAAACGGTCACTATACAGCGATTGCCACACATGACGACAAAATGATCGACTTTA
 CAAAGCAGCTTGCCAAGGAACATGGCATTGCCAATGACAAGTTTGAATTTGAGATGCT
 GTACGGCATGCGGTGCGAAACCCAGCTCAGCCTCGTAAAAGAAGGTTATAACATGAG
 AGTCTACCTGCCATACGGCGAGGATTGGTACGGCTACTTTATGAGACGCCTTGCAGA
 ACGTCCGTCAAACATTGCATTTGCTTTCAAAGGAATGACAAAGAAG (SEQ ID NO:52).

30

40

【0 2 1 6】

Y c d M タンパクの推定アミノ酸配列は、

【表 5 0】

MITRDFFLFLSKSGFLNKMARNWGSRVAAGKIIGGNDFNSSIPTIRQLNSQGLSVTVDDL
 GEFVNSAEVARERTEECIQTIATIDQELNSHVSLKMTSLGLDIDMDLVYENMTKILQTA
 EKHKIMVTIDMEDEVRCQKTLDFKDFRKKYEHVSTVLQAYLYRTEKDIDDLDSLNPFLR
 LVKGAYKESEKVAFPEKSDVDENYKKIIRKQLLNHYTAIATHDDKMIDFTKQLAKEHGI
 ANDKFEFQMLYGMRSQTQLSLVKEGYNMRVYLPYGEDWYGYFMRRLAERPSNIAFAFK
 GMTKK (SEQ ID NO:53).

【0 2 1 7】

更に、コード領域は B. スブチルス 1 6 8 染色体の約 3 4 4 1 1 1 ~ 3 4 5 0 1 9 b p 10
 において見出される。

【0 2 1 8】

B. スブチルス 1 6 8 の y c g N タンパク (1-ピロリン-5-カルボン酸デハイドロ
 ゲナーゼ) の y c g N コード配列を以下に示す。

【表 5 1】

ATGACAACACCTTACAAACACGAGCCATTACAAAATTTCCAAGATCAAAACTACGTGG
 AAGCGTTTAAAAAAGCGCTTGCGACAGTAAGCGAATATTTAGGAAAAGACTATCCGCT
 TGTCATTAACGGCGAGAGAGTGGAAACGGAAGCGAAAATCGTTTCAATCAACCCAGC
 TGATAAAGAAGAAGTCGTCGGCCGAGTGTCAAAGCGTCTCAAGAGCACGCTGAGC
 AAGCGATTCAAGCGGCTGCAAAAGCATTTGAAGAGTGGAGATACACGTCTCCTGAAG 20
 AGAGAGCGGCTGTCCTGTTCCGCGCTGCTGCCAAAGTCCGCAGAAGAAAACATGAA
 TTCTCAGCTTTGCTTGTGAAAGAAGCAGGAAAGCCTTGAACGAGGCGGATGCCGAT
 ACGGCTGAAGCGATTGACTTCATGGAGTATTATGCACGCCAAATGATCGAACTGGCA
 AAAGGCAAACCGGTCAACAGCCGTGAAGGCGAGAAAAACCAATATGTATACACGCCG
 ACTGGAGTGACAGTCGTTATCCCGCCTTGGAACCTTCTGTTTTCGATCATGGCAGGC
 ACAACAGTGGCGCCGATCGTTACTGGAAACACAGTGGTTCTGAAACCTGCGAGTGCT
 ACACCTGTTATTGCAGCAAAATTTGTTGAGGTGCTTGAAGAGTCCGATTGCCAAAAG
 GCGTAGTCAACTTTGTTCCGGGAAGCGGATCGGAAGTAGGCGACTATCTTGTTGACC
 ATCCGAAAACAAGCCTTATCACATTTACGGGATCAAGAGAAGTTGGTACGAGAATTTT
 CGAACGCGCGGCGAAGGTTTCAGCCGGGCCAGCAGCATTAAAGCGTGTCATCGCTG
 AAATGGGCGGTAAAGATACGGTTGTTGTTGATGAGGATGCGGACATTGAATTAGCGG 30
 CTCAATCGATCTTTACTTCAGCATTGCGCTTTGCGGGACAAAAATGCTCTGCAGGTTT
 ACGTGCAAGTAGTTTATGAAAAAGTGTATGATCAAGTATTAGAGCGTGTCATTGAAATT
 ACGGAATCAAAAGTAACAGCTAAACCTGACAGTGCAGATGTTTATATGGGACCTGTCA
 TTGACCAAGGTTCTTATGATAAAATTATGAGCTATATTGAGATCGGAAAACAGGAAGG
 GCGTTTAGTAAGCGGCGGTAAGTGGTATGATTGAAAGGATACTTCATCAAACCGAC
 GATCTTCGCTGACCTTGATCCGAAAGCAAGACTCATGCAGGAAGAAATTTTCGGACC
 TGTCGTTGCATTTTGTAAGTGTGAGACTTTGATGAAGCTTTAGAAGTGGCAAACAAT
 ACTGAATATGGTTTGACAGGCGCGGTTATCACAACAACCGCAAGCACATCGAGCGT
 GCGAAACAGGAATTCATGTCGGAAACCTATACTTCAACCGCAACTGTACAGGTGCT
 ATCGTCGGCTACCATCCGTTTGGCGGCTTCAAATGTGCGGGAACGGATTCAAAGCA
 GGCGGGCCGGATTACTTGCTCTGCATATGCAAGCAAAAACAATCAGTGAAATGTTT 40
 (SEQ ID NO:54).

【0 2 1 9】

Y c g N タンパクの推定アミノ酸配列は、

【表 5 2】

MTTPYKHEPFTNFQDQNYVEAFKKALATVSEYLGKDYPLVINGERVETEAKIVSINPADK
 EEVWGRVSKASQEHAEQAIQAAAKAFEEWRYTSPEERA AVLFRAAAKVRRRKHEFSALL
 VKEAGKPWNEADADTAE AIDFMEYYARQMIELAKGKPVNSREGEKNQYVYTPTGVTVVI
 PPWNFLFAIMAGTTVAPIVTGNTVVLKPASATPVIAAKFVEVLEESGLPKGVNFVPGSGS
 EVGDYLVDPKTSITFTGSREVGTTRIFERA AKVQPGQHLKR VIAEMGGKDTVVVDEDA
 DIELAAQSIFTSAFGFAGQKCSAGSRAVVHEKVYDQVLERVIEITESKV TAKPDSADVYMG
 PVIDQGSYDKIMSYIEIGKQEGRLVSGGTGDDSKGYFIKPTIFADLDPKARLMQEEIFGPVV
 AFCKVSDFDLEAVANNT EYGLTGAVITNNRKHIERAKQEFHVGNLYFN RNCTGAIVGYH
 PFGGFKMSGTDSKAGGPDYLALHMQAKTISEMF (SEQ ID NO:55).

10

【0 2 2 0】

更に、コード領域は B. スブチルス 1 6 8 染色体の約 3 4 5 0 3 9 ~ 3 4 6 5 8 3 b p
 において見出される。

【0 2 2 1】

B. スブチルス 1 6 8 の s i g D タンパク (R N A ポリメラーゼ 鞭毛、運動性、走化性
 および自己分解シグマ因子) の s i g D コード配列を以下に示す。

【表 5 3】

ATGCAATCCTTGAATTATGAAGATCAGGTGCTTTGGACGCGCTGGAAAGAGTGGA
 GATCCTAAAGCCGGTGACGACTTAATGCGCCGTTACATGCCGCTTGTACATATCAT
 GTAGGCAGAATTTCTGTGCGACTGCCGAAATCAGTGCATAAAGACGATCTTATGAGC
 CTTGGTATGCTTGGTTTATATGATGCCCTTGAAAAATTTGACCCCAGCCGGGACTTAA
 AATTTGATACCTACGCCTCGTTTAGAATTCGCGGCGCAATCATAGACGGGCTTCGTAA
 AGAAGATTGGCTGCCCAGAACCTCGCGCGAAAAAACA AAAAAGGTTGAAGCAGCAAT
 TGA AAAAGCTTGAACAGCGGTATCTTCGGAATGTATCGCCCGCGGAAATTGCAGAGGA
 ACTCGGAATGACGGTACAGGATGTCTGTCAACAATGAATGAAGGTTTTTTTGCAAAT
 CTGCTGTCAATTGATGAAAAGCTCCATGATCAAGATGACGGGGAAAACATTCAAGTCA
 TGATCAGAGATGACAAAAATGTTCCGCCTGAAGAAAAGATTATGAAGGATGAACTGAT
 TGCACAGCTTGCGGAAAAAATTCACGA ACTCTCTGAAAAAGAACAGCTGGTTGTCAG
 TTTGTTCTACAAAGAGGAGTTGACACTGACAGAAATCGGACAAGTATTAATCTTTCT
 ACGTCCCGCATATCTCAGATCCATTCAAAGGCATTATTTAAATTAAGAATCTGCTGG
 AAAAAGTGATACAA (SEQ ID NO:56).

20

30

【0 2 2 2】

S i g D の推定アミノ酸配列は、

【表 5 4】

MQSLNYEDQVLWTRWKEWKDPKAGDDL MRRYMPLVTYHVGRISVGLPKSVHKDDLMS
 LGMLGLYDALEKFDPSRD LKFD TYASFRI RGAIIDGLRKEDWLPRTSREKTKKVEAAIEKL
 EQRYLRNVSPA EIAEELGMTVQDVVSTMNEGFFANLLSIDEKLHDQDDGENIQVMIRDDK
 NVPPEEKIMKDELIAQLAEKIH ELSKEQLVSLFYKEELTLTEIGQVLNLSTSRISQIH SKA
 LFKLKNLLEKVIQ (SEQ ID NO:57).

40

【0 2 2 3】

更に、コード領域は B. スブチルス 1 6 8 染色体の約 1 7 1 5 7 8 6 ~ 1 7 1 6 5 4 7
 b p において見出される。

【0 2 2 4】

上記のように、他のバチルス宿主に見い出される不活性化された類似遺伝子は、本発明
 で使用され则认为られる。

【0 2 2 5】

いくつかの好ましい態様において宿主細胞はバチルス属の一員であり、一方、いくつか
 の態様において関心あるバチルス菌株は好アルカリ性である。多数の好アルカリ性バチル

50

ス菌株が知られている（米国特許US 5, 217, 878号、およびアウンストラップ他、Proc IV IFS: Ferment. Technol. Today、299-305頁[1972年]）。いくつかの好ましい態様において、関心あるバチルス菌株は工業用バチルス菌株である。工業用バチルス菌株の例には、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・レントゥス、バチルス・スブチルス、およびバチルス・アミロリケファシエンスが含まれるが、これに限定されない。更なる態様において、バチルス宿主菌株は、上述のバチルス属内の他の生物体と同様、バチルス・レントゥス、バチルス・ブレビス、バチルス・ステアロテルモフィルス、バチルス・アルカロフィルス、バチルス・コアグランス、バチルス・サーキュランス、バチルス・プミルス、バチルス・チューリングエンシス、バチルス・クラウシ、およびバチルス・メガテリウムからなる群から選択される。いくつかの特に好ましい態様において、バチルス・スブチルスが用いられる。他の適切な菌株が本発明における使用に考慮されるが、例えば、米国特許US 5, 264, 366号および4, 760, 025号（RE 34, 606）は、本発明で使用される多種のバチルス宿主菌株を記述している。

【0226】

工業用菌株には、バチルス種の非組換え菌株、自然由来の菌株の突然変異、または組換え菌株が可能である。好ましくは、前記宿主菌株は、関心あるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが宿主に導入されている組換え宿主菌株である。更に好ましい宿主菌株は、バチルス・スブチルス宿主菌株、およびとりわけ組換えバチルス・スブチルス宿主菌株である。1A6（ATCC 39085）、168（1A01）、SB19、W23、Ts85、B637、PB1753からPB1758まで、PB3360、JH642、1A243（ATCC 39, 087）、ATCC 21332、ATCC 6051、MI113、DE100（ATCC 39, 094）、GX4931、PBT110、およびPEP211菌株（例えば、ホック（Hoch）他、遺伝学、73巻、215-228頁[1973年]、米国特許US 4, 450, 235号、US 4, 302, 544号、および欧州特許EP 0134048号を参照されたい）を含むがこれに限定されない多数のバチルス・スブチルス菌株が知られている。発現宿主としてのバチルス・スブチルスの使用は、パルバ他およびその他（Palva他、遺伝子、19巻、81-87頁[1982年]、またファーネストックおよびフィッシャー（Fahnestock and Fischer）、J. Bacteriol.、165巻：796-804頁[1986年]、およびワン（Wang）他、遺伝子、69巻、39-47頁[1988年]も参照されたい）により更に記述されている。

【0227】

バチルス菌株を生産する工業用プロテアーゼは特に好ましい発現宿主を提供する。いくつかの好ましい態様において、本発明におけるこれら菌株の使用は、更なる効率およびプロテアーゼ生産の強化を提供する。プロテアーゼの二つの遺伝子タイプは、典型的にはバチルス種、すなわち、中性（または「メタロプロテアーゼ」）およびアルカリ（または「セリン」）プロテアーゼによって分泌される。セリンプロテアーゼは、活性部位に本質的なセリン残基があるペプチド結合の加水分解を触媒する酵素である。セリンプロテアーゼは、25, 000~30, 000の幅の分子量を有する（プリースト、Bacteriol. Rev.、41巻、711-753頁[1977年]）。スブチリシンは、本発明における使用にとって好ましいセリンプロテアーゼである。バチルス・スブチリシンの広範な種類は、例えば、スブチリシン168、スブチリシンBPN'、スブチリシン・カールスバーグ、スブチリシンDY、スブチリシン147、およびスブチリシン309が、同定され、および配列決定されている（例えば、EP 414279B号、WO 89/06279号、およびスター（Stahl）他、J. Bacteriol. Rev.、159巻、811-818頁[1984年]を参照されたい）。本発明のいくつかの態様において、バチルス宿主菌株は、突然変異（例えば、変異体）プロテアーゼを生産する。多数の引用文献が変異プロテアーゼの事例と参照を提供する（例えば、WO 99/20770号、WO 99/20726号、WO 99/20769号、WO 89/06279号、RE 34

、606号、米国特許US4,914,031号、米国特許US4,980,288号、米国特許US5,208,158号、米国特許US5,310,675号、米国特許US5,336,611号、米国特許US5,399,283号、米国特許US5,441,882号、米国特許US5,482,849号、米国特許US5,631,217号、米国特許US5,665,587号、米国特許US5,700,676号、米国特許US5,741,694号、米国特許US5,858,757号、米国特許US5,880,080号、米国特許US6,197,567号、および米国特許US6,218,165号を参照されたい)。

【0228】

更に他の態様において、好ましいバチルス宿主は、degU、degS、degR、およびdegQの遺伝子の少なくとも1つにおける突然変異または欠失を含むバチルス種である。好ましくは、前記突然変異はdegU遺伝子においてであり、より好ましくは突然変異はdegU(Hy)32である(ムサデク(Msadek)他、J. Bacteriol.、172巻、824-834頁[1990年]、およびオルモス(Olmas)他、Mol. Gen. Genet.、253巻、562-567[1997年]を参照されたい)。最も好ましい宿主菌株は、degU32(Hy)突然変異を有するバチルス・スプチルスである。更なる態様において、前記バチルス宿主は、scoC4(コールドウェル(Coldwell)他、J. Bacteriol.、183巻、7329-7340頁[2001年]を参照されたい)、spol1E(アリゴニ(Arigoni)他、Mol. Microbiol.、31巻、1407-1415頁[1999年]を参照されたい)、oppAまたはoppオペロンの他の遺伝子(ペレーゴ(Perego)他、Mol. Microbiol.、5巻、173-185頁[1991年]を参照されたい)における突然変異または欠失を含む。実際、oppAにおける突然変異として同一の表現型を生じさせるoppオペロンにおける任意の突然変異は、本発明の改変バチルス菌株のいくつかの態様において利用されることになると考えられる。いくつかの態様においてこれらの突然変異は単独で生じ、一方、他の態様において突然変異の組合せが存在する。いくつかの態様において、本発明の改変バチルスは、上記の遺伝子の1つ以上の突然変異を既に含むバチルス宿主菌株から得られる。代替的な態様において、本発明の改変バチルスは、上記の遺伝子の1つ以上の突然変異を含むように更に組み替えられる。

【0229】

更に他の態様において、外来配列は二つのloxP部位(クーンおよびトレス(Kuhn and Torres、Meth. Mol. Biol.、180巻、175-204頁[2002年]を参照されたい)の間に位置する選択マーカを含み、次に抗菌剤がCreタンパクの活動によって欠失される。いくつかの態様において、これは、相同隣接DNAおよび抗菌を含む外来DNAを構築するために用いられるプライマーにより決定される天然DNAの欠失と同様、単一のloxPの挿入をもたらす。

【0230】

当該業者は、バチルス細胞へのポリヌクレオチド配列の導入に関する適切な方法を十分に知っている(例えば、フェラーリ(Ferrari)他、「遺伝子学」ハーウッド(Harwood)他編『バチルス』所収、プレナム出版社[1989年]57-72頁を参照されたい。また、ソーンダース(Saunders)他、J. Bacteriol.、157巻、718-726頁[1984年]、ホック(Hoch)他、J. Bacteriol.、93巻、1925-1937頁[1967年]、マン(Mann)他、Current Microbiol.、13巻、131-135頁[1986年]、およびホルボヴァ(Holubova)、Folia Microbiol.、30巻、97頁[1985年]、バチルス・スプチルスに関しては、チャン(Chang)他、Mol. Gen. Genet.、168巻、11-115頁[1979年]、バチルス・メガテリウムに関しては、ヴォロビエヴァ(Vorobieva)他、FEMS Microbiol. Lett.、7巻、261-263頁[1980年]、バチルス・アミロリケファシエンスに関しては、スミス他、Appl. Env. Microbiol.、51巻、634

頁〔1986年〕、バチルス・チューリングエンシスに関しては、フィッシャー他、Arch. Microbiol.、139巻、213-217頁〔1981年〕およびバチルス・スファエリクス (sphaericus) に関しては、マクドナルド、J. Gen. Microbiol.、130巻、203頁〔1984年〕を参照されたい)。実際、プロトプラスト形質転換および会合、形質移入、およびプロトプラスト融合を含む形質転換の方法は既知であり、本発明における使用に好適である。形質転換の方法は、本発明によって提供されるDNAを宿主細胞に導入するために特に好ましい。

【0231】

一般的に使用される方法に加えて、いくつかの態様において宿主細胞は直接形質転換される（すなわち、中間細胞は、宿主細胞への導入に先立ってDNA構築体を増幅するために、または別の工程で、用いられない）。DNA構築体の宿主細胞への導入には、プラスミドまたはベクターへの挿入をしないで宿主細胞へDNAを導入するための、当該技術分野に既知の物理的、化学的方法が含まれる。そのような方法には、塩化カルシウム沈殿、エレクトロポレーション、裸のDNA、リボソームなどが含まれるが、それに限定されない。追加的な態様において、DNA構築体は、プラスミドへ挿入されないで、プラスミドと一緒に共形質転換 (co-transformed) される。更なる態様において、選択マーカーは当該技術分野で知られる方法により改変バチルス菌株から欠失される（スタール (Stahl) 他、J. Bacteriol.、158巻、411-418頁〔1984年〕、およびパルメロス (Palmeros) 他、遺伝子、247巻、255-264頁〔2000年〕を参照されたい)。

【0232】

いくつかの態様において宿主細胞は、二つ以上の遺伝子が宿主細胞で不活性化されている改変バチルス菌株を生産するために、本発明に従って1つ以上のDNA構築体を用いて形質転換される。いくつかの態様において、二つ以上の遺伝子が宿主細胞染色体から欠失される。代替的な態様において、二つ以上の遺伝子はDNA構築体の挿入によって不活性化される。いくつかの態様において不活性化された遺伝子は隣接しており（不活性化が欠失に依るものか、および／または挿入に依るものかに拘わらず）、一方、他の態様においてそれらは隣接遺伝子ではない。

【0233】

欠失、および細胞内および細胞外発現ポリペプチドの活性の測定については、当業者に既知の多数のアッセイがある。特にプロテアーゼについては、280nmにおける吸光度で、またはフォリン法を用いた比色分析で測定されるカゼインまたはヘモグロビン由来の酸可溶性ペプチドの放出に基づくアッセイがある（例えば、バーグメイヤー (Bergmeyer) 他、「酵素分析の方法」5巻、『ペプチダーゼ、プロテイナーゼおよびそれらの阻害剤』、Verlag Chemie社、ワインハイム〔1984年〕を参照されたい)。他のアッセイは、発色基質の可溶化を含む（例えば、ワード (Ward) 「プロテイナーゼ」、Fogarty編『微生物酵素およびバイオテクノロジー』所収、アプライド・サイエンス社、ロンドン〔1983年〕、251-317頁を参照されたい)。他のアッセイ例には、スクシニル-Ala-Ala-Pro-Phe-パラニトロアリニド・アッセイ (SAAPFpNA) および2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸・ナトリウム塩アッセイ (TNBSアッセイ) が含まれる。当業者に既知の多数の追加的な参考文献が、適切な方法を提供している（例えば、ウェルス (Wells) 他、Nucleic Acids Res.、11巻、7911-7925頁〔1983年〕、クリスチャンソン (Christianson) 他、Anal. Biochem.、223巻、119-129頁〔1994年〕、およびシャ (Hsia) 他、Anal. Biochem.、242巻、221-227頁〔1999年〕を参照されたい)。

【0234】

宿主細胞における関心あるタンパク質の分泌レベルの決定および発現タンパクの検出の手段には、タンパク質に対して特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いた免疫アッセイの使用が含まれる。具体例には、酵素免疫測定法 (ELISA)、ラジオ

10

20

30

40

50

イムノアッセイ (RIA)、蛍光イムノアッセイ (FIA)、および蛍光活性化セルソーティング (FACS) が含まれる。しかし、他の方法が当業者に既知であり、関心あるタンパクの評価において使用される (例えば、ハンプトン (Hampton) 他、『血清学的方法—実験室マニュアル』、APS 出版社、セントポール、ミネソタ州 [1990 年]、およびマドックス (Maddox) 他、J. Exp. Med.、158 巻、1211 頁 [1983 年] を参照されたい)。いくつかの好ましい態様において、関心あるタンパク質の分泌は、対応する未改変の宿主におけるよりも本発明を用いて得られた改変菌株においてより高い。当該技術分野に既知であるように、本発明を用いて生産された改変バチルス細胞は、細胞カルチャー由来の関心あるポリペプチドの発現および回収に好適な条件下で維持され、培養される (例えば、ハードウッドおよびカッティング (Hardwood and Cutting) 編集、『バチルスの分子生物学的方法』、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社 [1990 年] を参照されたい)。

【0235】

B. 大きな染色体欠失

上述のように、単一および多遺伝子欠失に加えて、本発明は大きな染色体欠失を提供する。本発明のいくつかの好ましい態様において、常在染色体領域またはそれらの断片は、改変バチルス菌株を生産するためにバチルス宿主細胞から欠失される。いくつかの態様において、前記常在染色体領域には、プロファージ領域、抗菌領域 (例えば、抗生剤領域)、制御領域、多隣接単一遺伝子領域および／またはオペロン領域が含まれる。本発明で言及される常在染色体領域を示す座標は、バチルス・スプチルス菌株 168 染色体マップに従って特定される。数は通常、それが存在するならば、リボソーム結合部位の発端と、またはコード領域の末端と関連しており、通常は存在可能なターミネータを含まない。菌株 168 のバチルス・スプチルスのゲノムは周知であり (クンスト (Kunst) 他、ネイチャー、390 巻、249-256 頁 [1997 年]、ヘンナー (Henner) 他、Microbiol. Rev.、44 巻、57-82 頁 [1980 年] を参照のされたい)、一つの 4215 kb 染色体からなる。しかし、本発明もまた、任意のバチルス菌株由来の類似配列を含む。特に好ましくは、他の B. スプチルス菌株、B. リケニフォルミス菌株、および B. アミロリケファシエンス菌株である。

【0236】

いくつかの態様において、前記常在染色体領域にはプロファージ切片およびそれらの断片が含まれる。「プロファージ切片」は、ウイルスの DNA が正常細菌遺伝子から効果的に区別できない細菌染色体へ挿入されているウイルスの DNA である。前記 B. スプチルスのゲノムは、多数のプロファージ切片からなり、これらの切片は感染性ではない (シーマン (Seaman) 他、Biochem.、3 巻、607-613 頁 [1964 年]、およびスティクラー (Stickler) 他、Virol.、26 巻、142-145 頁 [1965 年])。バチルス・スプチルスのプロファージ領域の任意の 1 つが欠失されることが可能であっても、参照は、以下の限定されない実施例のためになされる。

【0237】

本発明のいくつかの態様において欠失される一つのプロファージ領域は、「皮膚」要素の間に入るシグマ K である。この領域は、B. スプチルス 168 染色体の約 2652600 bp (spolVCA) から 2700579 bp (yqaB) において見出される。本発明を用いて、染色体の 2653562 bp ~ 2699604 bp に対応する約 46 kb の切片が欠失された。この要素は、spolVCB および spoIIIC 遺伝子の間の SIGK ORF 内に位置する祖先テンプレートファージの残留物と考えられている。しかし、本発明が、欠失領域に関与する任意の特定の機構または作用様式に限定されることを意味しない。前記要素は、推定リボソーム結合部位を有する 57 の読み取り枠を包含することが証明されている (タケマル他、Microbial.、141 巻、323-327 頁 [1995 年] を参照されたい)。母細胞における孢子形成の間、前記皮膚要素は切り出され、sigK 遺伝子の再構築を導く。

【0238】

欠失に適切なもう一つの領域は、プロファージ 7 領域である。この領域は、B. スブチルス 168 染色体の約 2701208 bp (y r k S) ~ 2749572 bp (y r a K) において見出される。本発明を用いて、染色体の 2701087 bp ~ 2749642 bp に対応する約 48.5 kb の切片が欠失された。

【0239】

更なる領域は、皮膚 + プロファージ 7 領域である。この領域は、B. スブチルス 168 染色体の約 2652151 bp ~ 2749642 bp において見出される。本発明を用いて、約 97.5 kb 切片が欠失された。この領域はまた介在 s p o I I C 遺伝子を含む。皮膚 / プロファージ 7 領域には、以下の遺伝子が含まれるが、これに限定されない。すなわち、s p o I V C A - D N A 組換え体、b l t (多剤耐性)、c y p A (シトクロム P 450 様酵素)、c z c D (陽イオン排出系膜タンパク)、および r a p E (応答調節因子アスパラギン酸ホスファターゼ) である。

10

【0240】

更に他の領域は P B S X 領域である。この領域は、B. スブチルス 168 染色体の約 1319884 bp (x k d A) ~ 1347491 bp (x l y A) において見出される。本発明を用いて、染色体の 1319663 bp ~ 1348691 bp に対応する約 29 kb の切片が欠失された。正常の非誘発条件下で、このプロファージ要素は感染性ではなく、および殺菌性でない (W 23 および S 31 のような、少数の感受性株を除いて)。それはマイトマイシン C により誘導性であり、S O S 反応により活性化され、ファージ様粒子の放出によって細胞融解をもたらす。このファージ粒子は細菌染色体 D N A を含み、D N A を注入することなく感受性細菌を殺す (C a n o s i 他、J. G e n. V i r o l.、39 巻: 81-90 頁 [1978 年])。この領域には以下の遺伝子の限定されないリストが含まれる。すなわち、x t m A - B、x k d A - K および M - X、x r e、x t r A、x p f、x e p、x h l A - B および x l y A である。

20

【0241】

更なる領域は、S P β 領域である。この領域は、B. スブチルス 168 染色体の約 2150824 bp (y o d U) ~ 2286246 bp (y p q P) において見出される。本発明を用いて、染色体の 2151827 bp ~ 2285246 bp に対応する約 133.5 kb の切片が欠失された。この要素は、その機能が依然として特徴付けられていないテンプレート・プロファージである。しかしながら、この領域における遺伝子には、推定胞子外皮タンパク (y o d U、s s p C、y o k H)、推定ストレス反応タンパク (y o r D、y p p Q、y p n P)、および y o m オペロンの一員のような胞子外皮タンパクにおける遺伝子およびストレス反応遺伝子とのホモログを有する他の遺伝子が含まれる。他の遺伝は、y o t、y o s、y o q、y o p、y o n、y o m、y o z、y o l、y o k、y p o、および y p m を含むこの領域である。

30

【0242】

追加的な領域は、プロファージ 1 領域である。この領域は、B. スブチルス 168 染色体の約 202098 bp (y b b U) ~ 220015 bp (y b d E) において見出される。本発明を用いて、染色体の 202112 bp ~ 220141 bp に対応する約 18.0 kb の切片が欠失された。この領域における遺伝子は、D N A アルキル化および N A D H デヒドロゲナーゼ、サブユニット 5 をコードする n d h F に対する順応的反応を示す A d a A / B オペロンを含む。

40

【0243】

更なる領域は、プロファージ 2 領域である。この領域は、B. スブチルス 168 染色体の約 529069 bp (y d c L) ~ 569493 bp (y d e J) において見出される。本発明を用いて、染色体の 529067 bp ~ 569578 bp に対応する約 40.5 kb の切片が欠失された。この領域における遺伝子には、r a p I / p h r I (応答調節因子アスパラギン酸ホスファターゼ)、s a c V (納豆菌の転写調節因子)、および c s p C が含まれる。

【0244】

50

他の領域は、プロファージ 3 領域である。本発明を用いて、B. スブチルス 1 6 8 染色体の約 6 5 2 0 0 0 b p ~ 6 6 4 3 0 0 p に対応する約 5 0 . 7 k b の切片が欠失された。

【0 2 4 5】

更に他の領域は、プロファージ 4 領域である。この領域は、B. スブチルス 1 6 8 染色体の約 1 2 6 3 0 1 7 b p (y j c M) ~ 1 3 1 3 6 2 7 b p (y j o A) において見出される。本発明を用いて、染色体の 1 2 6 2 9 8 7 b p ~ 1 3 1 3 6 9 2 b p に対応する約 2 . 3 k b の切片が欠失された。

【0 2 4 6】

追加的な領域は、プロファージ 5 領域である。本発明を用いて、B. スブチルス 1 6 8 染色体の約 1 8 7 9 2 0 0 b p ~ 1 9 0 0 0 0 0 b p に対応する約 2 0 . 8 k b の切片が欠失された。

【0 2 4 7】

他の領域は、プロファージ 6 領域である。本発明を用いて、B. スブチルス 1 6 8 染色体の約 2 0 4 6 0 5 0 b p ~ 2 0 7 8 0 0 0 b p に対応する約 3 1 . 9 k b の切片が欠失された。

【0 2 4 8】

更なる態様において、前記常在染色体領域には、1 つ以上のオペロン領域、多隣接単一遺伝子領域、および／または抗菌性領域が含まれる。いくつかの態様において、これらの領域には以下が含まれる。

【0 2 4 9】

P P S オペロン領域

この領域は、B. スブチルス 1 6 8 染色体の約 1 9 5 9 4 1 0 b p (p p s E) ~ 1 9 9 7 1 7 8 b p (p p s A) において見出される。本発明を用いて、染色体の約 1 9 6 0 4 0 9 ~ 1 9 9 8 0 2 6 b p に対応する約 3 8 . 6 k b の切片が欠失された。このオペロン領域は、抗菌性合成に関与し、プリバスタチン合成酵素をコードする。

【0 2 5 0】

P K S オペロン領域

この領域は、B. スブチルス 1 6 8 染色体の約 1 7 8 1 1 1 0 b p (p k s A) ~ 1 8 5 7 7 1 2 b p (p k s R) において見出される。本発明を用いて、染色体の約 1 7 8 1 7 9 5 ~ 1 8 5 7 9 8 5 b p に対応する約 7 6 . 2 k b の切片が欠失された。この領域は、ポリケチドシンターゼをコードし、抗菌性合成に関与する（スコッチ (S c o t t i) 他、遺伝子、1 3 0 巻、6 5 - 7 1 頁 [1 9 9 3 年]) 。

【0 2 5 1】

y v f F - y v e K オペロン領域

この領域は、B. スブチルス 1 6 8 染色体の約 3 5 1 3 1 4 9 b p (y v f F) ~ 3 5 2 8 1 8 4 b p (y v e K) において見出される。本発明を用いて、染色体の約 3 5 1 3 1 3 7 ~ 3 5 2 8 8 9 6 b p に対応する約 1 5 . 8 k b の切片が欠失された。この領域は、推定多糖類をコードする（ダルトワ (D a r t o i s) 他、バチルスに関する第 7 回国際会議 (1 9 9 3 年) 、パスツール研究所 [1 9 9 3 年] 、5 6 頁を参照されたい)。この領域には以下の遺伝子が含まれる。すなわち、y v f A - F 、y v e K - T 、および s l r である。B. スブチルス 1 6 8 染色体の約 3 5 2 9 0 1 4 ~ 3 5 2 9 6 0 3 b p において見出される s l r 遺伝子領域は、約 5 8 9 b p 切片を含む。この領域は y v f F - y v e K オペロンの制御領域である。

【0 2 5 2】

D H B オペロン領域

この領域は、B. スブチルス 1 6 8 染色体の約 3 2 7 9 7 5 0 b p (y u k L) ~ 3 2 9 3 2 0 6 b p (y u i H) において見出される。本発明を用いて、染色体の 3 2 7 9 4 1 8 ~ 3 2 9 2 9 2 0 b p に対応する約 1 3 . 0 k b の切片が欠失された。この領域は、カテコール性シデロフォン 2 , 3 - ジヒドロキ安息香酸 - グリシンスレオニン三量体エ

ステルバシリバクチンをコード化する（メイ（May）他、J. Biol. Chem.、276巻、7209-7217頁〔2001年〕を参照されたい）。この領域には以下の遺伝子が含まれる。すなわち、yukL、yukM、dhbA-C、EおよびF、およびyuiI-Hである。

【0253】

上述のように、前記領域は欠失されるべき好ましい常在染色体領域の具体例であり、一方、本発明のいくつかの態様において、前記領域の断片もまた欠失される。いくつかの態様において、そのような断片は常在染色体領域の約1%~99%の範囲を含む。他の態様において、断片は常在染色体領域の約5%~95%の範囲を含む。さらに追加的な態様において、断片は常在染色体領域の少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、90%、88%、85%、80%、75%、70%、65%、50%、40%、30%、25%、20%、および10%を含む。 10

【0254】

B. スプチルス168染色体における染色体位置を参照して削除されるべき常在染色体領域の断片の更なる非制限的な具体例は、以下を含む。すなわち、

a) 皮膚領域について

i) yqcCからyqaMを含む、約2666663から2693807の座標位置、および、

ii) rapEからphrEを含む、約2658440~2659688の座標位置、

b) PBSXプロフェージ領域について 20

i) xkdAからxkdXを含む、約1320043~1345263の座標位置、および、

ii) xkdEからxkdWを含む、約1326662~1345102の座標位置、

c) SPβ領域について

i) yodVからyonAを含む、約2149354~2237029の座標位置、

d) DHB領域について

i) dhbFからdhbAを含む、約3282879~3291353の座標位置、

e) yvfFからyveK領域について

i) yvfBからyveQを含む、約3516549~3522333の座標位置、

ii) yvfFからyveKを含む、約3513181~3528915の座標位置、 30

iii) yveQからyveLを含む、約3521233~3528205の座標位置

f) プロフェージ1領域について

i) ybcOからybdEを含む、約213926~220015の座標位置、および、

ii) ybcPからybdEを含む、約214146~220015の座標位置、

g) プロフェージ2領域について

i) rapIからcspCを含む、約546867~559005の座標位置、および 40

h) プロフェージ4領域について

i) yjcMからydjJを含む、約1263017~675421の座標位置、である。

【0255】

欠失に適切な常在染色体領域の断片の数は、断片が同定された常在染色体領域よりも少ないbpsからのみなることが可能であるために、多数である。更に、多くの同定された常在染色体領域は多数の遺伝子を含む。当業者は、どの常在染色体領域の断片が、特定の応用での使用に対する欠失に適切であるかを容易に決定することができる。

【0256】

常在染色体領域の定義は、定義された切片に多くの隣接ヌクレオチドを除外するほど厳 50

格ではない。例えば、S P β 領域は本発明においてB. スプチルス168染色体の座標の約2150824~2286246に位置すると定義され、一方、常在染色体領域は領域の両側に、更に10~5000bp、更に100~4000bp、または更に100~1000bpを含むことが可能である。領域の両側の多数のbpは、欠失の標的とされる常在染色体領域に含まれないもう一つの遺伝子の存在によって制限される。

【0257】

上述のように、本発明で開示された特定の領域の位置は、B. スプチルス168染色体で参照される。バチルス菌株由来の他の類似領域は、常在染色体領域の定義に含まれる。類似領域が任意のバチルス菌株において見出すことが可能であるのに対し、特に好ましい類似領域はバチルス・スプチルス菌株、バチルス・リケニフォルミス菌株およびバチルス・アミロリケファシエンス菌株に見出される。

10

【0258】

一定の態様において、1つ以上の常在染色体領域またはそれらの断片は、バチルス菌株から欠失される。しかしながら、1つ以上の常在染色体領域またはそれらの断片の欠失は、欠失を含む菌株の生殖依存度に有害に影響しない。いくつかの態様において、二つの常在染色体領域またはそれらの断片が欠失される。追加的な態様において、三つの常在染色体領域またはそれらの断片が欠失される。更に他の態様において、四つの常在染色体領域またはそれらの断片が欠失される。更なる態様において、五つの常在染色体領域またはそれらの断片が欠失される。他の態様において、14もの常在染色体領域またはそれらの断片が欠失される。いくつかの態様において前記常在染色体領域またはそれらの断片は隣接し、他方、他の態様においてそれらはバチルス染色体の別個の領域に位置する。

20

【0259】

欠失された常在染色体領域またはそれらの断片を含むバチルス属の任意の一員の菌株が、本発明において利用される。いくつかの好ましい態様において、前記バチルス菌株は、B. スプチルス菌株、B. アミロリケファシエンス菌株、B. レントゥス菌株、およびB. リケニフォルミス菌株からなる群より選択される。いくつかの好ましい態様において、前記菌株は工業用バチルス菌株、最も好ましくは工業用B. スプチルス菌株である。更に好ましい態様において、前記改変バチルス菌株はプロテアーゼ生産菌株である。いくつかの特に好ましい態様において、それはプロテアーゼ酵素をコード化するポリヌクレオチドを含むようにあらかじめ組み換えられているB. スプチルス菌株である。

30

【0260】

上述のように、常在染色体領域またはそれらの断片が欠失されているバチルス菌株は、本発明において「改変バチルス菌株」と呼ばれる。本発明の好ましい態様において、前記改変バチルス菌株は、関心あるタンパク質の増強された発現レベルを示す（すなわち、関心あるタンパク質の発現が、同一の培養条件下で培養された対応する未改変バチルス菌株と比較して、増強される）。

【0261】

増強の一つの測定法は関心あるタンパク質の分泌である。いくつかの態様において、関心あるタンパク質の生産は対応する未改変バチルス菌株と比べて、少なくとも0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、4.0%、5.0%、8.0%、10%、15%、20%、および25%またはそれ以上増強される。他の態様において、1リットル当たり生産されたタンパク質をグラム単位で測定した場合、関心あるタンパク質の生産は、対応する未改変バチルス菌株と比べて、約0.25%~20%、約0.5%~15%、および約1.0%~10%の間で増強される。

40

【0262】

常在染色体領域またはその断片の欠失を含む本発明により提供される改変バチルス菌株は、以下の手段を含むがこれに限定されない任意の適切な方法を用いて生産される。ある一般的な態様において、DNA構築体はバチルス宿主に導入される。DNA構築体は、不活性化染色体切片を含み、いくつかの態様において更に選択マーカを含む。好ましくは、選択マーカは不活性化染色体切片のある部分に、5'および3'末端の双方で隣接す

50

る。

【0263】

いくつかの態様において、不活性化染色体切片は好ましくは欠失されるべき常在染色体領域（または前記領域の断片）の直ぐ上流および下流に隣接したヌクレオチドと100%の配列同一性を有し、常在染色体領域の上流および下流ヌクレオチドと約70%～100%、約80%～100%、および約95%～100%の間の配列同一性を有する。不活性化染色体切片の各部分は、未改変宿主における常在染色体領域を用いた相同組換えを提供するために、常在染色体領域の十分な5'および3'隣接配列を含まなければならない。

【0264】

いくつかの態様において、前記不活性化染色体切片の各部分は、約50～10,000塩基対（bp）を含む。しかし、より低いまたはより高いbp部分は、本発明において使用される。好ましくは、各部分は、約50～5000bp、約100～5000bp、約100bp～3000bp、100bp～2000bp、約100～1000bp、約200～4000bp、約400～3000bp、約500～2000bp、および、また約800～1500bpである。

【0265】

いくつかの態様において、選択マーカーおよび不活性化常在染色体切片を含むDNA構築体は、*in vitro*で組み合わせられ、つぎにDNA構築体がバチルス染色体へ組み込まれるようになるために、前記構築体のコンピテント・バチルス宿主へ直接クローニングされる。例えば、PCR融合および／または連結は、*in vitro*でDNA構築体の組立てに適切である。いくつかの態様において、前記DNA構築体は非プラスミド構築体であり、一方、他の態様においてそれはベクターに組み込まれる（すなわち、プラスミド）。いくつかの態様において環状プラスミドが使用され、およびこの環状プラスミドは適当な制限酵素（すなわち、DNA構築体を分裂させない酵素）を用いて切断される。従って、線状プラスミドは、発明において使用される（例えば、図1、およびペレーゴ（Perego）『バチルス・スプチルスにおける遺伝子操作に関する組込ベクター』、ソネンシャイン（Sonenshein）他編、Am. Soc. Microbiol.、ワシントンDC、[1993年]を参照されたい）。

【0266】

いくつかの態様において、DNA構築体またはベクター、好ましくは不活性化染色体切片を含むプラスミドは、未改変宿主における常在染色体領域またはその断片を用いた相同組換えを提供するために、常在染色体切片またはそれらの断片の5'および3'隣接配列（seq）の十分な量を含む。他の態様において、DNA構築体は構築体の上流および下流末端において操作された制限部位を含む。本発明に従って有用で、座標位置に従って同定されたDNA構築体の非制限的な例には、以下が含まれる。すなわち、

【0267】

1. PBSX領域の欠失のためのDNA構築体：[yjqB末端およびリボソーム結合部位（RBS）を含んでいる完全yjpCを含む5'隣接配列1318874～1319860bp]－マーカー遺伝子－[ターミネータおよびpitの上流部分を含む3'隣接配列1348691～1349656bp]。

【0268】

2. プロファージ1領域の欠失のためのDNA構築体：[RBSおよびターミネータを含む完全glmSおよびybbURBSを含む5'隣接配列201248～202112bp]－マーカー遺伝子－[RBSを含む完全ybgdを含む3'隣接配列220141～221195bp]。

【0269】

3. プロファージ2領域の欠失のためのDNA構築体：[ydcK末端、trnS－Asn、trnS－Ser、trnS－Glu、trnS－Gln、trnS－Lys、trnS－Leu1およびtrnS－leu2である完全tRNAsを含む5'隣接配列527925～529067bp]－マーカー遺伝子－[完全ydeKおよびydeLの上流

部分を含む3'隣接配列569578～571062bp]。

【0270】

4、プロフェージ4領域の欠失のためのDNA構築体：[yjcMの部分を含む5'隣接配列1263127～1264270bp]—マーカー遺伝子—[RBSを含むyjoBの部分を含む3'隣接配列1313660～1314583bp]。

【0271】

5、yvfF—yveK領域の欠失のためのDNA構築体：[sigLの部分、完全yvfGおよびyvfFの発端を含む5'隣接配列3512061～3513161bp]—マーカー遺伝子—[完全slrおよびpnbAの発端を含む3'隣接配列3528896～3529810bp]。

10

【0272】

6、DHBオペロン領域の欠失のためのDNA構築体：[ターミネータを含むaldの末端、RBSを含む完全yuxI、RBSおよびターミネータを含む完全yukJ、およびyukLの末端を含む5'隣接配列3278457～3280255bp]—マーカー遺伝子—[RBSを含むyuiHの末端、RBSおよびターミネータを含む完全yuiG、およびターミネータを含むyuiFの上流末端を含む3'隣接配列3292919～3294076bp]。

【0273】

DNA構築体がベクターに組み込まれるか、またはプラスミドDNAの存在なしに使用されるかに拘わらず、それは微生物、好ましくは大腸菌細胞またはコンピテント・バチルス細胞に導入される。

20

【0274】

プラスミド構築体およびプラスミドの大腸菌への形質転換に関するバチルス細胞へのDNAの導入の方法はよく知られている。前記プラスミドは続いて大腸菌から単離され、バチルスへ形質転換される。しかし、大腸菌のような介在微生物を用いることは重要ではなく、いくつかの態様においてDNA構築体またはベクターが直接バチルス宿主へ導入される。

【0275】

好ましい態様において、前記宿主細胞はバチルス種である（例えば、米国特許US5,264,366号、米国特許US4,760,025号、およびRE34,6060を参照されたい）。いくつかの態様において、関心あるバチルス菌株は好アルカリ性バチルスである。多数の好アルカリ性バチルス菌株が知られる（例えば、米国特許US5,217,878号、およびアウンストラップ（Aunstrup）他、Proc IV IFS: Ferment. Technol. Today、299-305頁[1972年]）。特に関心あるバチルス菌株の他のタイプは、工業用バチルス菌株の細胞である。工業用バチルス菌株の例には、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・レントゥス、バチルス・スブチルス、およびバチルス・アミロリケファシエンスが含まれるが、これに限定されない。更なる態様において、バチルス宿主菌株は、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・スブチルス、バチルス・レントゥス、バチルス・ブレビス、バチルス・ステアロテルモフィルス、バチルス・アルカロフィルス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・コアグランス、バチルス・サーキュランス、バチルス・プミルス、バチルス・チューリングエンシス、バチルス・クラウシ、およびバチルス・メガテリウムからなる群より選択される。特に好ましい態様において、バチルス・スブチルス細胞が用いられる。

30

40

【0276】

いくつかの態様において、工業用宿主菌株は、バチルス種の非組換え菌株、自然発生のバチルス菌株の突然変異体、および組換えバチルス宿主菌株からなる群より選択される。好ましくは、宿主菌株は、関心あるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが宿主にあらかじめ導入される場合、組換え宿主菌株である。更に好ましい宿主菌株は、バチルス・スブチルス宿主菌株、およびとりわけ組換えバチルス・スブチルス宿主菌株である。多数のバチルス・スブチルス菌株が知られており、本発明の使用に好適である（例えば、1

50

A 6 (A T C C 3 9 0 8 5)、1 6 8 (1 A 0 1)、S B 1 9、W 2 3、T s 8 5、B 6 3 7、P B 1 7 5 3 から P B 1 7 5 8 まで、P B 3 3 6 0、J H 6 4 2、1 A 2 4 3 (A T C C 3 9, 0 8 7)、A T C C 2 1 3 3 2、A T C C 6 0 5 1、M I 1 1 3、D E 1 0 0 (A T C C 3 9, 0 9 4)、G X 4 9 3 1、P B T 1 1 0、および P E P 2 1 1 菌株；ホック (H o c h) 他、遺伝学、7 3 巻、2 1 5 - 2 2 8 頁 [1 9 7 3 年]、米国特許 U S 4, 4 5 0, 2 3 5 号、米国特許 U S 4, 3 0 2, 5 4 4 号、および欧州特許 E P 0 1 3 4 0 4 8 号；バルバ (P a l v a) 他、遺伝子、1 9 巻、8 1 - 8 7 頁 [1 9 8 2 年]、ファーンストックおよびフィッシャー (F a h n e s t o c k a n d F i s c h e r)、J. B a c t e r i o l.、1 6 5 巻、7 9 6 - 8 0 4 頁 [1 9 8 6 年]、およびワン (W a n g) 他、遺伝子、6 9 巻、3 9 - 4 7 頁 [1 9 8 8 年] を参照されたい)。10
発現宿主として特に関心あるのは、工業用プロテアーゼ生産バチルス菌株である。これらの菌株を用いることによってプロテアーゼ生産に見られる高い効率は、本発明の改変バチルス菌株によって更に増強される。

【0 2 7 7】

バチルス菌株を生産する工業用プロテアーゼは、特に好ましい発現宿主を提供する。いくつかの態様において、本発明におけるこれら菌株の使用は、効率およびプロテアーゼ生産における更なる増強を提供する。上記のように、プロテアーゼの二つの一般的タイプがあり、それらは典型的にバチルス種、すなわち中性（または「メタロプロテアーゼ」）およびアルカリ（または「セリン」）プロテアーゼによって分泌される。また、上記のように、スブチリシンは、本発明における使用にとって好ましいセリンプロテアーゼである。20
広範なバチルス・スブチリシンは、例えば、スブチリシン 1 6 8、スブチリシン B P N、スブチリシン・カールスバーグ、スブチリシン D Y、スブチリシン 1 4 7、およびスブチリシン 3 0 9 が、同定され、および配列決定されている（例えば、E P 4 1 4 2 7 9 B 号、W O 8 9 / 0 6 2 7 9 号、およびスタール (S t a h l) 他、J. B a c t e r i o l.、1 5 9 巻、8 1 1 - 8 1 8 頁 [1 9 8 4 年] を参照されたい)。本発明のいくつかの態様において、バチルス宿主菌株は、突然変異（例えば、変異体）プロテアーゼを生産する。多数の引用文献が変異プロテアーゼの例および参照を提供する（例えば、W O 9 9 / 2 0 7 7 0 号、W O 9 9 / 2 0 7 2 6 号、W O 9 9 / 2 0 7 6 9 号、W O 8 9 / 0 6 2 7 9 号、R E 3 4, 6 0 6 号、米国特許 U S 4, 9 1 4, 0 3 1 号、米国特許 U S 4, 9 8 0, 2 8 8 号、米国特許 U S 5, 2 0 8, 1 5 8 号、米国特許 U S 5, 3 1 0, 6 7 5 30
号、米国特許 U S 5, 3 3 6, 6 1 1 号、米国特許 U S 5, 3 9 9, 2 8 3 号、米国特許 U S 5, 4 4 1, 8 8 2 号、米国特許 U S 5, 4 8 2, 8 4 9 号、米国特許 U S 5, 6 3 1, 2 1 7 号、米国特許 U S 5, 6 6 5, 5 8 7 号、米国特許 U S 5, 7 0 0, 6 7 6 号、米国特許 U S 5, 7 4 1, 6 9 4 号、米国特許 U S 5, 8 5 8, 7 5 7 号、米国特許 U S 5, 8 8 0, 0 8 0 号、米国特許 U S 6, 1 9 7, 5 6 7 号、および米国特許 U S 6, 2 1 8, 1 6 5 号を参照されたい）。

【0 2 7 8】

更に他の態様において、好ましいバチルス宿主は、d e g U、d e g S、d e g R、および d e g Q の遺伝子の少なくとも 1 つにおける、突然変異または欠失を含むバチルス種である。好ましくは、前記突然変異は d e g U 遺伝子におけるものであり、より好ましくは前記突然変異は d e g U (H y) 3 2 である（ムサデク (M s a d e k) 他、J. B a c t e r i o l.、1 7 2 巻、8 2 4 - 8 3 4 頁 [1 9 9 0 年]、およびオルモス (O l m a s) 他、M o l. G e n. G e n e t.、2 5 3 巻、5 6 2 - 5 6 7 頁 [1 9 9 7 年] を参照されたい)。最も好ましい宿主菌株は、d e g U 3 2 (H y) 突然変異を有するバチルス・スブチルスである。更なる態様において、前記バチルス宿主は、s c o C 4 (コールドウェル (C o l d w e l l) 他、J. B a c t e r i o l.、1 8 3 巻、7 3 2 9 - 7 3 4 0 頁 [2 0 0 1 年] を参照されたい)、s p o l l E (アリゴニ (A r i g o n i) 他、M o l. M i c r o b i o l.、3 1 巻、1 4 0 7 - 1 4 1 5 頁 [1 9 9 9 年] を参照されたい)、o p p A または o p p オペロンの他の遺伝子（ペレーゴ (P e r e g o) 他、M o l. M i c r o b i o l.、5 巻、1 7 3 - 1 8 5 頁 [1 9 9 1 年] を 40
50

参照されたい)における突然変異または欠失を含む。実際、oppA遺伝子における突然変異として同一の表現型を生じさせるoppオペロンにおける任意の突然変異は、本発明の改変バチルス菌株のいくつかの態様において利用されることになると考えられる。いくつかの態様において、これらの突然変異は単独で生じ、一方、他の態様において突然変異の組合せが存在する。いくつかの態様において、本発明の改変バチルスは、上記の遺伝子の1つ以上における突然変異を既に含むバチルス宿主菌株から得られる。代替的な態様において、本発明の改変バチルスは、上記の遺伝子の1つ以上の突然変異を含むように更に操作されている。

【0279】

いくつかの態様において、二つ以上のDNA構築体がバチルス宿主細胞に導入され、改変バチルスにおける二つ以上の常在染色体領域の欠失をもたらす。いくつかの態様において、これらの領域は隣接している(例えば、皮膚とプロファージ7領域)が、他方、他の態様において前記領域は離れている(例えば、PBSSX領域およびPKS領域、皮膚領域およびDHB領域、またはPKS領域、SPβ領域およびyvff-yveK領域)。

【0280】

当業者は、ポリスクレオチド配列を細菌(例えば、大腸菌およびバチルス)細胞に導入する適切な方法について十分知っている(例えば、フェラーリ(Ferrari)他、「遺伝学」、ハードウッド(Hardwood)他編『バチルス』、プレナム出版社、[1989年]57-72頁を参照されたい。更に、ソーンドース(Saunders)他、J. Bacteriol.、157巻、718-726頁[1984年]、ホック(Hoch)他、J. Bacteriol.、93巻、1925-1937頁[1967年]、マン(Mann)他、Current Microbiol.、13巻、131-135頁[1986年]、およびホルボヴァ(Holubova)、Folia Microbiol.、30巻、97頁[1985年]、バチルス・スプチルスに関しては、チャン(Chang)他、Mol. Gen. Genet.、168巻、11-115頁[1979年]、バチルス・メガテリウムに関しては、ヴォロビエヴァ(Vorobieva)他、FEMS Microbiol. Lett.、7巻、261-263頁[1980年]、バチルス・アミロリケファシエンスに関しては、スミス他、Appl. Env. Microbiol.、51巻、634頁[1986年]、バチルス・チューリングイエンスに関しては、フィッシャー他、Arch. Microbiol.、139巻、213-217頁[1981年]、およびバチルス・スファエリクスに関しては、マクドナルド、J. Gen. Microbiol.、130巻、203頁[1984年]を参照されたい)。実際、プロトプラスト形質転換および会合、形質移入、およびプロトプラスト融合を含む形質転換の方法は既知であり、本発明における使用に好適である。形質転換の方法は、本発明によって提供されるDNA構築体を宿主細胞に導入するために特に好ましい。

【0281】

共通に使用される方法に加えて、いくつかの態様において宿主細胞は直接形質転換される(すなわち、中間細胞は、宿主細胞への導入に先立ってDNA構築体を増幅するために、または別の工程で、用いられない)。DNA構築体の宿主細胞への導入には、プラスミドまたはベクターへの挿入をしないで宿主細胞へDNAを導入するための、当該技術分野に既知の物理的、化学的方法が含まれる。そのような方法には、塩化カルシウム沈殿、エレクトロポレーション、裸のDNA、リポソームなどが含まれるが、それらに限定されない。追加的な態様において、DNA構築体は、プラスミドへ挿入されないで、プラスミドと一緒に形質転換される。更なる態様において、選択マーカーは、当該技術分野で知られる方法により改変バチルス菌株から欠失、または実質的に切り出される(スタール(Stahl)他、J. Bacteriol.、158巻、411-418頁[1984年]、およびパルメロス(Palmeros)他、遺伝子、247巻、255-264頁[2000年]に記述されている、パルメロス他の保存的部位特異的組換え(CSSR)法を参照されたい)。いくつかの好ましい態様において、宿主染色体からのベクターの分離は、染色体における隣接領域を放置し、一方、常在染色体領域を除去する。

【0282】

いくつかの態様において宿主細胞は、二つ以上の遺伝子が宿主細胞で不活性化されている改変バチルス菌株を生産するために、本発明に従って1つ以上のDNA構築体を用いて形質転換される。いくつかの態様において、二つ以上の遺伝子が宿主細胞染色体から欠失される。代替的な態様において、二つ以上の遺伝子はDNA構築体の挿入によって不活性化される。いくつかの態様において不活性化された遺伝子は隣接し、（不活性化が欠失に依るものか、および／または挿入に依るものかに拘わらず）一方、他の態様においてそれらは隣接遺伝子ではない。

【0283】

上記のように、細胞内および細胞外発現ポリペプチドの活性検出および測定については、当業者に既知の多数のアッセイがある。特にプロテアーゼについては、280nmにおける吸光度またはフォリン法を用いた比色分析で測定されたカゼインまたはヘモグロビン由来の酸可溶性のペプチドの放出に基づくアッセイがある（例えば、バーグメイヤー（Bergmeyer）他、「酵素分析の方法」、5巻、『ペプチダーゼ、プロテイナーゼおよびそれらの阻害剤』、Verlag Chemie社、ワインハイム[1984年]を参照されたい）。他のアッセイは、発色基質の可溶化を含む（例えば、ワード（Ward）「プロテイナーゼ」、Fogarty編『微生物酵素およびバイオテクノロジー』所収、アプライド・サイエンス社、ロンドン[1983年]251-317頁を参照されたい）。他のアッセイの具体例には、スクシニル-Ala-Ala-Pro-Phe-パラニトロアリニド・アッセイ（SAAPFpNA）および2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム塩アッセイ（TNBSアッセイ）が含まれる。当業者に既知の多数の追加的な引用文献が適切な方法を提供している（例えば、ウェルス（Wells）他、Nucleic Acids Res.、11巻、7911-7925頁[1983年]、クリスチャンソン（Christianson）他、Anal. Biochem.、223巻、119-129頁[1994年]、およびシャ（Hsia）他、Anal. Biochem.、242巻、221-227頁[1994年]を参照されたい）。 10 20

【0284】

更に上記のように、宿主細胞における関心あるタンパク質の分泌レベルの決定および発現タンパクの検出の手段には、タンパク質に対して特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いた免疫アッセイの使用が含まれる。具体例には、酵素免疫測定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、蛍光イムノアッセイ（FIA）、および蛍光活性化セルソーティング（FACS）が含まれる。しかし、他の方法は当業者に既知であり、関心あるタンパクの評価において使用される（例えば、ハンプトン（Hampton）他、『血清学的方法—実験室マニュアル』、APS出版社、セントポール、ミネソタ州[1990年]、およびマドックス（Maddox）他、J. Exp. Med.、158巻、1211頁[1983年]を参照されたい）。いくつかの好ましい態様において、関心あるタンパク質の分泌は、対応する未改変の宿主におけるよりも本発明を用いて得られた改変菌株においてより高い。当該技術分野に既知であるように、本発明を用いて生産された改変バチルス細胞は、細胞カルチャーからの関心あるポリペプチドの発現および回収に適切な条件下で維持され、培養される（例えば、ハードウッドおよびカッティング（Hardwood and Cutting）編集、『バチルスの分子生物学的方法』、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社[1990年]を参照されたい）。 30 40

【0285】

当該技術分野で既知であるように、細菌はインキュベーションの間の増殖および多種のタンパク質の合成のために、一定の炭素源を利用する。多くの場合、炭素源のコストが重要な要素になり、細胞によるその使用の最適化が菌株改良の共通の目標であるために、経済的側面が関係する。本発明で記述したように転写アレイを、関心あるプロテアーゼを生産するバチルス・スブチルス菌株の発酵の分析のために用いた。これらの実験の間、いくつかの代謝反応を同定し（例えば、pckA）、それらの修飾はがグリコースおよびその他の炭素源を利用するためにバチルス・スブチルスの効率を改善することが認められた。 50

特に関心あるのは、オキサロ酢酸をホスホエノールピルビン酸塩に転換する補充反応であり、それはホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (p c k A) 酵素 (E C 4 . 1 . 1 . 4 9) によって触媒される。これは、一定の培養条件下で無益回路であり得ると考えられている。p c k A の役割をより完全に分析するために、p c k A 領域における欠失を含むパチルス・スプチルス構築体を、本発明で記述された P C R 融合方法を用いて調製した。細胞増殖、炭素収率、およびプロテアーゼ生産に対するこれらの欠失の効果を分析した。p c k A 欠失突然変異体菌株は、複合培地に存在する炭素の利用において (バイオマスになる少なくとも 10 % 炭素の増大で示されるように) より効率的であり、プロテアーゼ生産はこの培地において (細胞あたりで) 影響されなかった。しかし、最小培地において、突然変異 p c k A 菌株は、コントロール菌株と比べてプロテアーゼおよび細胞をより多く生産することができることがわかった。実施例 6 により詳述するように、p c k A 欠失菌株、K H B 5 は、L A ⁺ 1 . 6 % スキムミルクプレート上で、コントロール親菌株、F N A ハイパー 1 よりも大きなハコを作ることができた (すなわち、親菌より多くのプロテアーゼが突然変異によって生産された)。更に、前記 p c k A 欠失菌株、K H B 5 は最小培地で、コントロール親菌株、F N A ハイパー 1 よりも高い光学密度に達することが出来た (すなわち、唯一の炭素源としてのグルコースを用いて)。これらの結果は、突然変異菌株が同量の炭素から親菌株よりも多くの細胞を生産したことを示している。

【0286】

本発明を実施する様式や方法は、以下の実施例の参照により当業者により十分に認識される。前記実施例は、本発明またはそこで示されたクレームの範囲を制限する任意の方法を意味するものではない。

【実施例】

【0287】

実験

以下の実施例は、本発明のある好ましい態様および側面を明示およびさらに説明するために提供されるものであり、その範囲を限定するものとして解釈されない。

【0288】

以下の実験開示において、以下の略語を適用する。すなわち、°C (摂氏温度)、r p m (分当たりの回転数)、H₂O (水)、d H₂O (脱イオン水)、H C l (塩酸)、a a (アミノ酸)、b p (塩基対)、k b (キロ塩基対)、k D (キロダルトン)、g m (グラム)、μ g (マイクログラム)、m g (ミリグラム)、n g (ナノグラム)、μ l (マイクロリットル)、m l (ミリリットル)、m m (ミリメートル)、n m (ナノメートル)、μ m (マイクロメートル)、M (モル)、m M (ミリモル)、μ M (マイクロモル)、U (ユニット)、V (ボルト)、M W (分子量)、s e c (秒)、m i n (s) (分)、h r (s) (時間)、M g C l₂ (塩化マグネシウム)、N a C l (塩化ナトリウム)、O D₂₈₀ (280 nm における光学密度)、O D₆₀₀ (600 nm における光学密度)、P A G E (ポリアクリルアミドゲル電気泳動法)、P B S (リン酸緩衝生理食塩水 [150 mM 塩化ナトリウム、10 mM リン酸ナトリウムバッファ、p H 7 . 2])、P E G (ポリエチレン・グリコール)、E T F (経過発酵時間)、P C R (ポリメラーゼ連鎖反応)、R T - P C R (逆転写 P C R)、S D S (ドデシル塩酸ナトリウム)、T r i s (トリス [ヒドロキシメチル] アミノメタン)、w / v (容積に対する重量)、v / v (容積 / 容積)、L A 培地 (リットル当たりのディフコ社製トリプトンペプトン 20 g、ディフコ社製イースト抽出物 10 g、E M サイエンス社製塩化ナトリウム 1 g、E M サイエンス社製寒天 17 . 5 g、1 リットルについて d H₂O)、L A ⁺ 1 . 6 % スキムミルクプレートは以下の化合物を含む：ディフコ社製トリプトン 10 g m、ディフコ社製イースト抽出物 5 g m、塩化ナトリウム 0 . 5 g m、17 . 5 g m の寒天、および最終容積 1 リットルの蒸留水)。A T C C (アメリカンタイプカルチャーコレクション、ロックビル、メリーランド州)、C l o n t e c h (クロンテック・ラボラトリー社、パロアルト、カリフォルニア州)、D i f c o (ディフコ・ラボラトリー社、デトロイト、ミシガン州)、G I B C O B R L または G i b c o B R L (ライフテクノロジー社、ゲーサーズバ

ーグ、メリーランド州)、Invitrogen (インヴィトロジェン社、サンディエゴ、カリフォルニア州)、NEB (ニューイングランドバイオラボ、ビバリー、マサチューセッツ州)、Sigma (シグマケミカル社、セントルイス、ミズーリ州)、Takara (タカラバイオ社、大津、日本)、Roche Diagnostics and Roshe (ロシュ・ダイアグノスティックス社、ホフマン・ラ・ロシュ社の事業部、バーゼル、スイス)、EM Science (EMサイエンス社、ギブスタウン、ニュージャージー州)、Qiagen (キアゲン社、バレンシア、カリフォルニア州)、Stratagene (ストラタジーン・クローニング・システムズ社、ラヨラ、カルフォルニア州)、Affymetrix (アフィメトリクス社、サンタクララ、カリフォルニア州)である。

10

【0289】

実施例 1

欠失菌株の作成

この実施例は、図1にも示されている「方法1」を記述する。この方法において、バチルス菌株に形質転換されることになるDNA構築体を保有するpJM102プラスミドベクターを生産するために、大腸菌を使用した。(上記ペレーゴ(Perego)を参照されたい)。欠失部位の5'および3'末端に直接隣接する領域を、PCR増幅した。バチルス・スプチルス染色体と相同である31塩基対、およびプライマーの5'末端由来の6塩基対に位置する6塩基対制限酵素部位を含む長さ約37塩基対になるように、PCRプライマーを設計した。構築体の上流および下流末端の特異な制限部位、およびクローニグに用いるための二つの断片間のBamH1部位を操作するために、プライマーを設計した。抗菌マーカー用のプライマーは、断片の両末端にBamH1部位を有した。可能であれば、欠失した常在染色体領域のプロモーターを除去するように、しかし、直ぐ隣接区域に全てのターミネータを残すように、PCRプライマーを設計した。染色体配列、遺伝子位置決め、およびプロモータおよびターミネータ情報の一次資料は、クンスト他(997年、上記参照)から、また当業者に既知のSubtilistワールドワイドウェブサーバーからも得た(例えば、モッツァー他、上記参照)。多数の欠失を、本発明を用いて作成した。この方法により作られた欠失からのプライマー配列のリストを、表1に示す。プライマー表記システムの説明のために図2にも参照を作成した。

20

【0290】

30

【表 5 5】

表 1. プライマー

プライマー名	プライマーに 操作された 制限酵素	プライマー配列	配列番号
PBSX-UF	XbaI	CTACATTCTAGACGATTTGTTTGATCGATATGTGGAAGC	60
PBSX-UR	BamHI	GGCTGAGGATCCATTCCTCAGCCCAGAAGAGAACCTA	61
PBSX-DF	BamHI	TCCCTCGGATCCGAAATAGGTTCTGCTTATTGTATTCTG	62
PBSX-DR	SacI	AGCGTTGAGCTCGCGCCATGCCATTATATTGGCTGCTG	63
Pphage 1-	EcoRI	GTGACGGAATTCCACGTGCGTCTTATATTGCTGAGCTT	64
Pphage 1-	BamHI	CGTTTTGGATCCAAAAACACCCCTTTAGATAATCTTAT	65
Pphage 1-	BamHI	ATCAAAGGATCCGCTATGCTCCAAATGTACACCTTTCCGT	66
Pphage 1-	PstI	ATATTTCTGCAGGCTGATATAAATAATACTGTGTGTTCC	67
Pphage 2-	SacI	CATCTTGAATTCAAAGGGTACAAGCACAGAGACAGAG	68
Pphage 2-	BamHI	TGACTTGGATCCGGTAAGTGGGCAGTTTGTGGGCAGT	69
Pphage 2-	BamHI	TAGATAGGATCCTATTGAAAAGTGTAAAGAAGAGGA	70
Pphage 2-	PstI	CTGATTCTGCAGGAGTGTGTTTGAAGGAAGCTTCATT	71
Pphage 4-	KpnI	CTCCGCGGTACCGTCACGAATGCGCCTCTTATTCTAT	72
Pphage 4-	BamHI	TCGCTGGGATCCTTGGCGCCGTGGAATCGATTTTGTCC	73
Pphage 4-	BamHI	GCAATGGGATCCTATATCAACGGTTATGAATTCACAA	74
Pphage 4-	PstI	CCAGAACTGCAGGAGCGAGGCGTCTCGCTGCCTGAAA	75

10

20

【 0 2 9 1 】

【表 5 6】

(表 1 の続き)

PPS-UF	SacI	GACAAGGAGCTCATGAAAAAAGCATAAAGCTTTATGTTGC	76
PPS-UR	BamHI	GACAAGGGATCCCGGCATGTCCGTTATTACTTAATTC	77
PPS-DF	BamHI	GACAAGGGATCCTGCCGCTTACCGGAAACGGA	78
PPS-DR	XbaI	GACAAGTCTAGATTATCGTTTGTGCAGTATTACTTG	79
SPβ-UF	SacI	ACTGATGAGCTCTGCCTAAACAGCAAACAGCAGAAC	80
SPβ-UR	BamHI	ACGAATGGATCCATCATAAAGCCGCAGCAGATTAAATAT	81
SPβ-DF	BamHI	ACTGATGGATCCATCTTCGATAAATATGAAAGTGGC	82
SPβ-DR	XbaI	ACTGATTCTAGAGCCTTTTCTCTTGATGCAATTCTTC	83
PKS-UF	XbaI	GAGCCTCTAGAGCCCATGAATCATTGTGTT	84
PKS-UR	BamHI	GAGCCGGATCCTTAAGGATGTCGTTTTGTGTCT	85
PKS-DF	BamHI	GAGCCGGATCCATTTCGGGGTTCTCAAAAAA	86
PKS-DR	SacI	GAGCCGAGCTCATGCAAATGGAAAAATTGAT	87
Skin-UF	XbaI	GAAGTTCTAGAGATTGTAATTACAAAAGGGGGTG	88
Skin-UR	BamHI	GAAGTGGATCCTTTCACCGATCATAAAAGCCC	89
Skin-DF	BamHI	TGAAAGGATCCATTTTTCATTGATTGTTAAGTC	90
Skin-DR	SacI	GAAGTTAGAGCTCGGGGGGGCATAAATTTCCCG	91
Phleo-UF	BamHI	GCTTATGGATCCGATACAAGAGAGGTCTCTCG	92
Phleo-DR	BamHI	GCTTATGGATCCCTGTATGCGCGCATTAAACG	93
Spec-UF	BamHI	ACTGATGGATCCATCGATTTTCGTTCTGAATACATG	94
Spec-DR	BamHI	ACTGATGGATCCCATATGCAAGGGTTTATTGTTTC	95
CssS-UF	XbaI	GCACGTTCTAGACCACCGTCCCTGTGTTGTATCCAC	96
CssS-UR	BamHI	AGGAAGGGATCCAGAGCGAGGAAGATGTAGGATGATC	97
CssS-DF	BamHI	TGACAAGGATCCTGTATCATACCGCATAGCAGTGCC	98
CssS-DR	SacI	TTCCGCGAGCTCGGCGAGAGCTTCAGACTCCGTCAGA	99
SBO-	XbaI	GAGCCTCTAGATCAGCGATTTGACGCGGCGC	100
SBO-	BamHI	TTATCTGGATCCCTGATGAGCAATGATGGTAAGATAGA	101
SBO-	BamHI	GGGTAA GGATCC CCCAAAAGGGCATAGTCATTCTACT	102
SBO-	Asp718	GAGATCGGTACC CTTTGGGCCATATCGTGGATTC	103
PhrC-UF	HindIII	GAGCC AAGCTT CATTGACAGCAACCAGGCAGATCTC	104
PhrC-DF	PstI	GCTTATAAGCTTGATACAAGAGAGGTCTCTCG	105
PhrC-UR	PstI	GCTTATAAGCTTCTGTCATGGCGCATTAAACG	106
PhrC-DR	SacI	GAGCCGAGCTC CATGCCGATGAAGTCATCGTCGAGC	107
PhrC-UF-	HindIII	CGTGAA AAGCTT TCGCGGGATGTATGAATTTGATAAG	108
PhrC-DR-	SacI	TGTAGGGAGCTC GATGCGCCACAATGTCGGTACAACG	109

制限部位は次のように示される。XbaIはTCTAGA、BamHIはGGATCC、SacIはGAGCTC、Asp718はGGTACC、PstIはCTGCAG、および HindIIIはAAGCTTである。また、プロファージは“Pphage”と示される。

【0292】

この方法において、84 μLの水、10 μLのPCRバッファ、1 μLの各プライマー（すなわち、PKS-UFおよびPKS-UR）、2 μLのdNTPs、1 μLの野生型バチルス染色体DNA鋳型、および1 μLのポリメラーゼを含む150 mLエッペンドルフ管において100 μLのPCR反応を行なった。使用したポリメラーゼには、Taqプラス精密ポリメラーゼおよびHERCULASE（登録商標）ポリメラーゼ（ストラタジーン社製）が含まれた。反応は以下のプログラムを用いて、Hybaid PCRエク

プレスサーモサイクラーにおいて行なった。サンプルを、最初に 94℃で 5 分間加熱し、次に 50℃を維持するまで冷却した。ポリメラーゼをこの時点で添加した。25 サイクルの増幅は、95℃で 1 分、50℃で 1 分、および 72℃で 1 分からなった。最後の 72℃で 10 分は完全な伸長を確実にものとした。サンプルは分析のために 4℃を保持した。

【0293】

PCRの完了後、正しい大きさでバンドが存在するかを点検するために、10 μLの各反応物をインビトロゲン社製 1.2%アガロースEゲルにおいて、60ボルトで30分間操作した。本発明で記述される全てのゲル電気泳動の方法にはこの条件を用いた。バンドが存在した場合、反応管の残部は製造会社の取扱説明書に従ってキアゲン社製キアクイック（登録商標）PCR精製キットを用いて精製し、次に適当な制限酵素ペアを用いて切断した。消化は、9 μLの水、2 μLの10×BSA、2 μLの適当なNEB制限バッファ（2000-01NEBカタログおよび技術参照に従って）、5 μLの鋳型、および1 μLの核制限酵素からなる20 μLの反応として、37℃で1時間行なった。例えば、PBSX上流断片およびC s s S上流断片を、NEB（ニューイングランドビオラボズ社製）制限バッファBにおいて、X b a IおよびB a m H Iを用いて切断した。消化された断片を、ゲル電気泳動および製造業者の取扱説明書に従ってキアゲン社製キアクイック（登録商標）ゲル抽出キットを用いた抽出により精製した。図5および6は、種々の欠失の結果を表すゲルを示す。

10

【0294】

断片のプラスミド・ベクターへの連結は、製造業者の取扱説明書に従ってタカラ連結キット、またはT4DNAリガーゼ（反応内容物：5 μLの各挿入断片、1 μLの切断pJM102プラスミド、3 μLのT4DNAリガーゼバッファおよび1 μLのT4DNAリガーゼ）のいずれかを使用して二段階で行なった。最初に、切断上流および下流断片を、一晚15℃でpJM102プラスミドポリリンカーにおいて、特異制限部位へ連結し、環状プラスミドを再形成するために共通のB a m H I部位で結合した。前記pJM102プラスミドを各欠失に適当な特異制限部位を用いて切断し（表2を参照されたい。c s s S、X b a I、およびS a c Iについて用いた）、および上記のように連結に先立って精製した。再環化プラスミドを、製造会社のワン・ショット形質転換プロトコルを用いて、インビトロゲンの「トップ・テン」大腸菌細胞に形質転換した。

20

【0295】

形質転換体を、1.5%の寒天（LA）プラス青／白スクリーニング用のX-galを含む50 ppmのカルバニシリンを用いて凝固したルリア・バータニ培地において選択した。クローンを選択し、一晚37℃で、5 mLのルリア・バータニ培地（LB）プラス50 ppmのカルバニシリンにおいて増殖させ、プラスミドをキアゲン社製のキアクイック（登録商標）ミニプレブキットを用いて単離した。制限分析は、プラスミドから約2 kbバンドを取除くために、挿入部の各末端において制限部位を用いて切断することにより挿入部の存在を確認した。挿入部を有する確認済みのプラスミドを、上記のように消化反応において線状化するためにB a m H Iを用いて切断し（第二制限酵素の代わりに追加的に1 μLの水を用いて）、再環化を防ぐために1時間37℃で1 μLの牛腸およびエビのホスファターゼを用いて処理し、表2に記載のように、抗菌耐性マーカーに結合した。抗菌マーカーをB a m H Iを用いて切断し、結合に先立って製造業者の取扱説明書に従い、キアゲン・ゲル抽出キットを用いて洗浄した。このプラスミドを、選択に適当なように5 ppmのフレオマイシン（p h l）または100 ppmのスペクチノマイシン（s p c）を用いて、前のように大腸菌にクローンした。単離されたプラスミドにおけるマーカーの挿入の確認を上記のようにB a m H Iを用いた制限分析によって行なった。バチルス・スプチルスへの形質転換に先立って、前記プラスミドを二重のクロスオーバー現象を確実にするためにS c a Iを用いて線状化した。

30

40

【0296】

【表 5 7】

表 2. 欠失構築体に用いられる特異制限酵素ペア

欠失名	特異制限酵素ペア	抗微生物マーカ
<i>Sbo</i>	XbaI-Asp718	spc
<i>Slr</i>	XbaI – SacI	phleo
<i>YbcO</i>	XbaI – SacI	spc
<i>Csn</i>	XbaI – Sall	phleo
<i>PBSX</i>	XbaI-SacI	phl
<i>PKS</i>	XbaI-SacI	phl
<i>SPβ</i>	XbaI-SacI	spec
<i>PPS</i>	XbaI-SacI	spec
<i>Skin</i>	XbaI-SacI	phl

10

20

【0297】

実施例 2A

大腸菌をバイパスするためのPCR融合を用いたDNA構築体の作成

この実施例は、図3にも示されている「方法2」を記述する。プライマーを抗菌マーカのプライマー配列と相補的である25bp「テイル」を用いて設計したことを除いて、方法1と同様に上流および下流の断片を増幅した。「テイル」は、本発明において直接増幅される配列と相同ではないが、もう一つのDNA配列と相補的なプライマーの5'末端の塩基対と定義される。同様に、抗菌剤を増幅するプライマーは、前記断片のプライマーと相補的である「テイル」を含む。任意の所与の欠失について、前期欠失X-UFfusおよび欠失X-URfusは相互に相補体である。これはまた、DF-fusおよびDF-fusプライマーセットについても当てはまる。更に、いくつかの態様において、これらのプライマーはプラスミド・ベクター作成用の方法1において用いられるものと類似する制限酵素部位を有する（表3および米国特許US5,023,171を参照されたい）。表3はPCR融合による欠失構築体の作成に有用なプライマーのリストを提供する。表4はPCR融合による欠失構築体の作成に有用なプライマーの追加リストを提供する。しかし、この表において、全ての欠失構築体phleo^Rマーカを含むことになる。

30

【0298】

【表 58】

表3. プライマー

プライマー名	プライマーに 操作された 制限酵素	配列	配列番号
DHB-UF	XbaI	CGAGAATCTAGAACAGGATGAATCATCTGTGGCGGG	110
DHB-UFfus-phleo	BamHI	CGACTGTCCAGCCGCTCGGCACATCGGATCCGCTTA CCGAAAGCCAGACTCAGCAA	111
DHB-URfus-phleo	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTTCGGTAAGCGGATCCGATGTG CCGAGCGGCTGGACAGTCG	112
DHB-DFfus-phleo	BamHI	CGTTAATGCGCCATGACAGCCATGAGGATCCCACAA GCCCCGACGCCTTGCCACAC	113
DHB-DRfus-phleo	BamHI	GTGTGGCAAGGCGTGCGGGCTTGTGGGATCCTCATG GCTGTCATGGCGCATTAAACG	114
DHB-DR	SacI	GACTTCGTCGACGAGTGCGGACGGCCAGCATCACCA	115
DHB-UF-nested	XbaI	GGCATATCTAGAGACATGAAGCGGGAAACAGATG	116
DHB-DR-nested	SacI	GGTGCGGAGCTCGACAGTATCACAGCCAGCGCTG	117
YvF-yveK-UF	XbaI	AAGCGTTCTAGACTGCGGATGCAGATCGATCTCGGG	118
YvF-yveK-UF- phleo	BamHI	AACCTTCCGCTCACATGTGAGCAGGGGATCC GCTTACCGAAAGCCAGACTCAGCAA	119
YvF-yveK-UR- phleo	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTTCGGTAAGCGGATCC CCTGCTCACATGTGAGCGGAAGGTT	120
YvF-yveK-DF- phleo	BamHI	CGTTAATGCGCCATGACAGCCATGAGGATCC GCCTTCAGCCTTCCCGCGGCTGGCT	121
YvF-yveK-DR- phleo	BamHI	AGCCAGCCGCGGGAAGGCTGAAGCGGGATCC TCATGGCTGTCATGGCGCATTAAACG	122
YvF-yveK-DR	PstI	CAAGCACTGCAGCCCACACTTCAGGCGGCTCAGGTC	123
YvF-yveK-UF-	XbaI	GAGATATCTAGAATGGTATGAAGCGGAATTCCTCG	124
YvF-yveK-DR-	KpnI	ATAAACGGTACCCCCCTATAGATGCGAACGTTAGCCC	125
プロファージ 7-UF	EcoRI	AAGGAGGAATTCCATCTTGAGGTATACAAACAGTCAT	126
プロファージ 7-UF-	BamHI	TCTCCGAGAAAGACAGGCAGGATCGGGATCC	127
プロファージ 7-UR-	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTTCGGTAAGCGGATCC	128
皮膚+プロファージ 7	Asp718	AAGGACGGTACCGGCTCATTACCCTCTTTCAAGGGT	129
皮膚+pro7-UF- phleo	BamHI	ACCAAAGCCGGAATCCCCCGAGAGGATCC GCTTACCGAAAGCCAGACTCAGCAA	130
皮膚+pro7-UR- phleo	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTTCGGTAAGCGGATCC TCTCGCGGGGAGTCCGGCTTTGGT	131
皮膚+pro7-DF- phleo	BamHI	CGTTAATGCGCCATGACAGCCATGA GGATCCCATACGGGGTACACAATGTACCATA	132
皮膚+pro7-DR- phleo	BamHI	TATGGTACATTGTGTACCCCGTATGGGATCC TCATGGCTGTCATGGCGCATTAAACG	133
皮膚+pro7-DR	PstI	GTCAACCTGCAGAGCGGCCAGGTACAAGTTGGGGA	134
皮膚+pro7-UF-	SacI	GGATCAGAGCTCGCTTGTCTCCTCTGGGAACAGCCGG	135
皮膚+pro7-DR-	PstI	TATATGCTGCAGGGCTCAGACGGTACCGGTTGTTCT	136

制限部位は次のように示される。XbaIはTCTAGA、BamHIはGGATCC、SacIはGAGCTC、Asp718はGGTACC、PstIはCTGCAG、および HindIIIはAAGCTTである。

【表 5 9】

表 4. PCR 融合*により欠失構築体を作成するために用いられる追加プライマー

プライマー名	プライマーに 操作された 制限酵素	配列	配列 番号
Slr-UF	XbaI	CTGAACTCTAGACCTTCACCAGGCACAGAGGAGGTGA	137
Slr-Uffus	BamHI	GCCAATAAGTTCTCTTTAGAGAACAGGATCC GCTTACCGAAAGCCAGACTCAGCAA	138
Slr-Urfus	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTTCGGTAAGCGGATCCTTGTTCTCT AAAGAGAACTTATTGGC	139
Slr-Dffus	BamHI	CGTTAATGCGCCATGACAGCCATGAGGATCC GGGCTAACGTCGCATCTATAGGGG	140
Slr-Drfus	BamHI	CCCCTATAGATGCGAACGTTAGCCC GGATCC TCATGGCTGTCATGGCGCATTAACG	141
Slr-DR	SacI	TGAGACGAGCTCGATGCATAGGCGACGGCAGGGCGCC	142
Slr-UF- nested	XbaI	CGAAATTCTAGATCCCGCGATTCCGCCCTTTGTGG	143
Slr-DR-nested	SacI	TTCCAAGAGCTCGCGGAATACCGGAAGCAGCCCC	144
YbcO-UF	XbaI	CAATTCTCTAGAGCGGTCGGCGCAGGTATAGGAGGGG	145
YbcO-UF	BamHI	GAAAAGAAACCAAAAAGAATGGGAAGGATCC GCTTACCGAAAGCCAGACTCAGCAA	146
YbcO-UR	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTTCGGTAAGCGGATCC TTCCATTCTTTTGGTTTCTTTTC	147
YbcO-DF	BamHI	CGTTAATGCGCCATGACAGCCATGAGGATCC GCTATTTAACATTTGAGAATAGGGA	148
YbcO-DR	BamHI	TCCCTATTCTCAAATGTTAAATAGCGGATCC TCATGGCTGTCATGGCGCATTAACG	149
YbcO-DR	SacI	CAGGCGGAGCTCCCATTTATGACGTGCTTCCCTAAGC	150
Csn-UF	XbaI	TACGAATCTAGAGATCATTGCGGAAGTAGAAGTGAA	151

10

20

30

【 0 3 0 0 】

【表 6 0】

(表 4 の続き)

Csn-UF	BamHI	TTTAGATTGAGTTCATCTGCAGCGGGGATCC GCTTACCGAAAGCCAGACTCAGCAA	152
Csn-UR	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTCGGTAAGCGGATCC CCGCTGCAGATGAACTCAATCTAAA	153
Csn-DF	BamHI	CGTTAATGCGCCATGACAGCCATGAGGATCC GCCAATCAGCCTTAGCCCTCTCAC	154
Csn-DR	BamHI	GTGAGAGGGGCTAAGGCTGATTGGCGGATCC TCATGGCTGTCATGGCGCATTAACG	155
Csn-DR	Sall	ATACTCGTCGACATACGTTGAATTGCCGAGAAGCCGC	156
Csn-UF-	NA	CTGGAGTACCTGGATCTGGATCTCC	157
Csn-DR-	NA	GCTCGGCTTGTTTCAGCTCATTTCC	158
SigB-UF	SacI	CGGTTTGAGCTCGGCTCCTGATCTGCAGAAGCTCATT	159
SigB-UF	BamHI	CTAAAGATGAAGTCGATCGGCTCATGGATCC GCTTACCGAAAGCCAGACTCAGCAA	160
SigB-UR	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTCGGTAAGCGGATCC ATGAGCCGATCGACTTCATCTTTAG	161
SigB-DF	BamHI	CGTTAATGCGCCATGACAGCCATGAGGATCC GAAGATCCCTCGATGGAGTTAATGT	162
SigB-DR	BamHI	ACATTAAGTCCATCGAGGGATCTTCGGATCC TCATGGCTGTCATGGCGCATTAACG	163
SigB-DR	Sall	GCTTCGGTCGACTTTGCCGTCTGGATATGCGTCTCTCG	164
SigB-UF-	SacI	GTCAAAGAGCTCTATGACAGCCTCCTCAAATTGCAGG	165
SigB-DR-	Sall	TTCCATGTCGACGCTGTGCAAAACCGCCGGCAGCGCC	166
SpolISA-UF	EcoRI	ACATTGCAATTCAGCAGGTCAATCAGCTCGCTGACGC	167
SpolISA-UF	BamHI	CCAGCACTGCGCTCCCTCACCCGAAGGATCC GCTTACCGAAAGCCAGACTCAGCAA	168
SpolISA-UR	BamHI	TTGCTGAGTCTGGCTTTCGGTAAGCGGATCC TTCGGGTGAGGGAGCGCAGTGCTGG	169
SpolISA-DF	BamHI	CGTTAATGCGCCATGACAGCCATGAGGATCC TCGAGAGATCCGGATGGTTTCTCTG	170
SpolISA-DR	BamHI	CAGGAAAACCATCCGGATCTCTCGAGGATCC TCATGGCTGTCATGGCGCATTAACG	171
SpolISA-DR	HindIII	AGTCAT AAGCTTTCTGGCGTTTGATTTCATCAACGGG	172
SpolISA-UF-	NA	CAGCGCGACTTGTTAAGGGACAATA	173
SpolISA-DR-	NA	GGCTGCTGTGATGAACTTTGTCTGGA	174

*全ての欠失構築体は phleo (登録商標) マーカーを含む

【0301】

表 3 および 4 に記載した断片を、上記のようにゲル電気泳動法によりサイズ確認した。正しい場合、各 1 μ L の上流、下流、および抗菌耐性マーカー断片を、前記欠失 X-U F および欠失 X-D R プライマーまたは記載されたネステッド (nested) プライマーを用いて単一の反応管に入れた。ネステッドプライマーは、上流または下流断片の内部部分と相同である DNA の 25 塩基ペアであり、通常断片の外側末端から約 100 塩基ペアである (図 2 を参照されたい)。ネステッドプライマーの利用は、しばしば融合の成功を増す。PCR 反応成分は、82 μ L の水が追加の鋳型容器を補うために用いられることを除き、上記のものと同様であった。前記 PCR 反応条件は、72 $^{\circ}$ C の伸長が 3 分まで延長されることを除いては、上記のものと同じであった。伸長の間、抗菌耐性遺伝子を、上流

10

20

30

40

50

および下流の断片の間で融合した。この融合断片は、任意の精製工程なしに、または製造業者の取扱説明書に従って行なわれる単一のキアゲン・キアクイック（登録商標）PCR精製を用いて、直接パチルスに形質転換することができる。

【0302】

実施例 2B

大腸菌をバイパスするためにPCR融合を用いたpckA欠失構築体の作成

上記欠失に加えて、pckAもまた修飾される。前記PCRプライマーpckAUF、pckA-2Urfus、spc ffus、spc rfus、pckA DffusおよびpckA DRを、鋳型としてB. スプチルス168誘導体の染色体DNAおよびpDG1726（Guérout-Fleury他、遺伝子、167巻（1-2）、335-336頁〔1995年〕を参照されたい）を使用したPCRおよびPCR融合反応に用いた。前記プライマーを表5に示す。これらの欠失変異体の構築に用いる方法は、上述の方法1と同じであった。

【0303】

【表61】

表5. PckA欠失に用いられるプライマー

プライマー名	プライマーに操作された制限酵素	配列	配列番号
pckA UF (PCK-1)	None	TTTGCTTCCTCCTGCACAAGGCCTC	199
pckA-2Urfus (PCK-2)	None	CGTTATTGTGTGTGCATTTCATTGT	200
spc ffus (PCK-3)	None	CAATGGAAATGCACACACAATAACGTGACTGGCAA GAGA	201
pckA Dffus (PCK-4)	None	GTAATGGCCCTCTCGTATAAAAAAC	202
spc rfus (PCK-5)	None	GTTTTTTTATACGAGAGGGCCATTACCAATTAGAAT GAATATTTCCC	203
pckA DR (PCK-6)	None	GACCAAAATGTTTCGATTTCAGCATTTCCT	204

【0304】

実施例 3

大腸菌クローニング段階をバイパスするためのPCR断片の連結を用いたDNA構築体の作成およびパチルス・スプチルスの直接形質転換

この実施例において、PCR断片の連結を用いたDNA構築体を作成およびパチルスの直接形質転換の方法（「方法3」）を記述する。具体例によって、連結方法を示すためにprpC、sigD、およびtdh/kblの修飾を示す。実際にsigD、およびtdh/kblを1つの方法により、およびprpCを代替の方法で構築した。

【0305】

A. Tdh/KblおよびSigD

B. スプチルス染色体のtdh/kbl領域に隣接する上流および下流断片を、隣接DNAの内側プライマーをタイプIIの制限部位を含むように設計したこと以外は方法1の記述と同様のPCRにより増幅した。loxP-スベクチノマイシン-loxPカセットのプライマーを、隣接し相補的に突出した同じタイプII制限部位を用いて設計した。左側面および右側面について特異な突出は、DNAに隣接する上流および下流の間の抗菌カセットの直接的な連結を可能とした。全てのDNA断片を適当な制限酵素を用いて消化し、前記断片を製造業者の取扱説明書を使用してキアゲン社製キアクイック（登録商標）P

C R 精製キットを用いて精製した。この精製に続いて、B i o R a d P - 6 ゲルを含む 1 m L のスピнкаラムで脱塩し、2 m M の T r i s - H C l、p H 7. 5 で平衡化した。断片を、サバント・スピード・バック S C 1 1 0 システムを用いて 1 2 4 ~ 2 5 0 n g / μ L まで濃縮した。各断片 0. 8 ~ 1 μ g の 3 つの小片の連結を、1 4 ~ 1 6 $^{\circ}$ C で 1 6 時間、1 5 ~ 2 5 μ L の反応容積で、1 2 U T 4 リガーゼ（ロシュ社製）を用いて行なった。所望の連結生産物の総収量は、アガロースゲル上における標準 D N A ラダーとの比較計算で、反応当たり 1 0 0 n g より大であった。この連結混合物を形質転換反応のために精製をしないで使用した。この構築体用のプライマーを以下の表 6 に示す。

【 0 3 0 6 】

【表 6 2】

表 6. tdh/kbI 欠失用のプライマー

プライマー名	プライマーに 操作された 制限酵素	配列	配列 番号
p70 DR	none	CTCAGTTCATCCATCAAATCACCAAGTCCG	175
P82 DF	BbsI	TACACGTTAGAAGACGGCTAGATGCGTCTGATTGTGACAGAC GGCG	176
p71 UF	none	AACCTTCCAGTCCGGTTTACTGTCCG	177
P83 UR	BbsI	GTACCATAAGAAGACGGAGCTTGCCGTGTCCACTCCGATTAT AGCAG	178
p98spc F	BbsI	CCTTGTCTTGAAGACGGAGCTGGATCCATAACTTCGTATAATG	179
p106 spc R	BbsI	GTACCATAAGAAGACGGCTAGAGGATGCATATGGCGGCCGC	180
p112 UF*	none	CATATGCTCCGGCTCTCAAGCAAG (analytical primer)	181
p113 DR*	none	CCTGAGATTGATAAACATGAAGTCCTC (analytical primer)	182

*分析 PCR 用のプライマー

【 0 3 0 7 】

s i g D 欠失用の構築体が、t d h / k b I の構築体に近接して続いた。s i g D 用の構築体に用いられるプライマーを表 7 に示す。

【 0 3 0 8 】

【表 6 3】

表 7. sigD 構築体用のプライマー

プライマー名	プライマーに 操作された 制限酵素	配列	配列番号
SigD UF	None	ATATTGAAGTCGGCTGGATTGTGG	183
SigD UR	BglII	GCGGCAGATCTCGGCGCATTAAGTCGTCA	184
SigD DF	EcoRI	GCGGCGAATTCTCTGCTGGAAAAAGTGATACA	185
SigD DR	None	TTCGCTGGGATAACAACAT	186
Loxspc UF	BglII	GCGGCAGATCTTAAGCTGGATCCATAACTTCG	187
Loxspc DR	EcoRI	GCGGCGAATTCATATGGCGGCCGCATAACTTC	188
SigD UO	None	CAATTTACGCGGGGTGGTG	189
SigD DO	None	GAATAGGTTACGCAGTTGTTG	190
Spc UR	None	CTCCTGATCCAAACATGTAAG	191
Spc DF	None	AACCCTTGCATATGTCTAG	192

【 0 3 0 9 】

B. P r p C

PCRの連結によるDNA分子を作成する追加的な実施例により、遺伝子p r p Cの部分的インフレーム欠失を含むバチルス・スプチルス・スプチルスの直接形質転換用のDNA断片を増幅した。p r p C遺伝子を含むB. スプチルス染色体DNAのA 3 9 5 3 b p断片を、プライマーp 9 5およびp 9 6を用いるPCRで増幅した。前記断片を特異制限部位P f l M IおよびB s t X Iにおいて開裂した。これにより、三つの断片、上流、下流、および中央の断片が生成した。後者は欠失された断片であり、p r p C遺伝子の内部に位置する1 7 0 b pとなる。前記消化混合物を、キアゲン社製キアクイック（登録商標）PCR精製キットを用いて精製し、続いてB i o R a d社製P-6ゲルを含む1 m Lのスピнкаラムにおいて脱塩し、2 m M T r i s-H C l、p H 7. 5で平衡化した。第二PCR反応において、ゲノムDNA断片における部位と相補的な開裂部位をともに有する、B s t X I部位を含むプライマーおよびP f I M Iを含む下流プライマーを用いて、抗菌カセット、l o x P-スぺクチノマイシン-l o x Pを増幅した。前記断片をP f I M IおよびB s t X Iを用いて消化し、上記染色体断片について記述したように精製した。上流、抗菌カセット、および下流断片の三つの小片の連結を、上記t d h / k b lのように行なった。所望の連結生産物の収量は同様であり、連結生産物を下記に詳述するように、x y l R c o m Kコンピテント・バチルス・スプチルスの形質転換のための更なる処理をしないで用いた。

【0 3 1 0】

【表 6 3】

表 8. prpC 欠失用のプライマー

プライマー名	プライマーに操作された制限酵素	配列	配列番号
p95 DF	None	GCGCCCTTGATCCTAAGTCAGATGAAAC	193
p96 UR	None	CGGGTCCGATACTGACTGTAAGTTTGAC	194
p100 spc R	PfIMl	GTACCATAACCATGCCTTGGTTAGGATGCATATGGCGGCCGC	195
p101 spc F	BstXI	CCTTGTCTTCCATCTTGCTGGAGCTGGATCCATAACTTCGTATAATG	196
p114 anal.	None	GAGAGCAAGGACATGACATTGACGC	197
p115 anal.,*	None	GATCTTCACCCTCTTCAACTTGTAAG	198

*anal.は分析 PCR プライマーを意味する。

【0 3 1 1】

C. キシロース誘導コンピテント宿主細胞の連携したDNAを用いる形質転換

部分的遺伝子型x y l R c o m Kを有する宿主株バチルス・スプチルスの細胞を、1 %のキシロースを含むルリア・バータニ培地における2時間の培養によって形質転換受容性（c o m p e t e n t）にした。これは、米国特許出願番号0 9 / 9 2 7, 1 6 1号、（出願日2 0 0 1年8月10日）に記述されており、1のO D_{5 5 0}まで参照により本発明に組み込まれる。この培養物は6時間培養から播種した。全培養物は3 0 0 r p mで振とうしながら3 7 °Cで培養した。0. 3 m Lの分量を、丸底型2 m L管において培養液および3 0 %グリセロールの1 : 1混合物として凍結し、将来使えるように液体窒素において保存した。

【0 3 1 2】

形質転換のために、凍結したコンピテント細胞を3 7 °Cで解凍し、解凍完了後直ちに連結反応混合物からのDNAを管当たり5 ~ 1 5 μ Lのレベルで添加した。次に管を3 7 °Cで6 0分間1 4 0 0 r p m（テクマル社製（T e k m a r）V X R S-1 0）で振とう

した。形質転換混合物を100 ppmのスペクチノマイシンを含む8 cmのLAプレート上に希釈しないで100 uLの分割量でとった。一晚の培養の後、形質転換体をルリア・バータニ培地（100 ppmスペクチノマイシン）に移し、当該技術分野で知られているように実施されるゲノムDNA分離のために37℃で増殖した（例えば、ハードウッドおよびカッティング、『バチルス分子生物学的方法』、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社、ニューヨーク、ニューヨーク州、[1990年] 23頁を参照されたい）。典型的には、5 uLの連結反応混合物を形質転換体に用いる場合、100 uLの形質転換混合物から400～1400の形質転換体を得た。

【0313】

抗菌マーカーを外來配列における二つのloxP部位の間に位置させた時、Creタンパク発現できるcre遺伝子を含むプラスミドを用いる菌株の形質転換によって前記マーカーを除去することができた。細胞を37℃～40度で培養したpCRM-TS-pleo（以下を参照されたい）を用いて形質転換し、LA上にとり、コロニーが形成した後に100 ppmスペクチノマイシンを含むLA上にパッチ（patch）した。マーカーの喪失を、所定の遺伝子に適するプライマーを用いたPCRアッセイによって確認した。

【0314】

【表65】

```

GGGGATCTCTGCAGTGAGATCTGGTAATGACTCTCTAGCTTGAGGCATCAAATAAAACGAAAG
GCTCAGTCGAAAGACTGGGCCCTTTGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTA
GGACAAATCCGCCGCTCTAGCTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCT
ACAAACTCTTGTTAACTCTAGAGCTGCCTGCCGCGTTTCGGTGATGAAGATCTTCCCGATGATT
AATTAATTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATGCAGCAATGGCAAGAACGTTGC
TCTAGAATAATTCTACACAGCCAGTCCAGACTATTGGGCACTGAAATTATGGGTGAAGTGGTC
AAGACCTCACTAGGCACCTTAAAAATAGCGCACCCCTGAAGAAGATTTATTTGAGGTAGCCCTT
GCCTACCTAGCTTCCAAGAAAGATATCCTAACAGCACAAGAGCGGAAAGATGTTTTGTTCTACA
TCCAGAACAACCTCTGCTAAAATTCCTGAAAAATTTGCAAAAAGTTGTTGACTTTATCTACAAG
GTGTGGCATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTAAGCTTAGGAGGGAGTGTTAAATG
TCCAATTTACTGACCGTACACCAAAAATTTGCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGAGTGATGAG
GTTTCGCAAGAACCTGATGGACATGTTTCAGGGATCGCCAGGCGTTTTCTGAGCATACCTGGAAA
ATGCTTCTGTCCGTTTGCCGGTCGTGGGCGGCATGGTGCAAGTTGAATAACCGGAAATGGTTT
CCCGCAGAACCTGAAGATGTTTCGCGATTATCTTCTATATCTTCAGGCGCGCGGTCTGGCAGTA
AAACTATCCAGCAACATTTGGGCCAGCTAAACATGCTTCATCGTCGGTCCGGGCTGCCACGA
CCAAGTGACAGCAATGCTGTTTCACTGGTTATGCGGCGGATCCGAAAAGAAAACGTTGATGCC
GGTGAACGTGCAAAACAGGCTCTAGCGTTTCAACGCACTGATTTGACCCAGGTTGTTCACTC
ATGGAAAATAGCGATCGCTGCCAGGATATACGTAATCTGGCATTTCTGGGGATTGCTTATAACA
CCCTGTTACGTATAGCCGAAATTGCCAGGATCAGGGTTAAAGATATCTCACGTAAGTACGGTG
GGAGAATGTTAATCCATATTGGCAGAACGAAACGCTGGTTAGCACCGCAGGTGTAGAGAAG
GCACTTAGCCTGGGGGTAACATAAAGTGGTCGAGCGATGGATTTCCGTCTCTGGTGTAGCTGAT
GATCCGAATAACTACCTGTTTTGCCGGGTGAGAAAAATGGTGTTGCCGCGCCATCTGCCACC
AGCCAGCTATCAACTCGCGCCCTGGAAGGGATTTTTGAAGCAACTCATCGATTGATTTACGGC
GCTAAGGATGACTCTGGTCAGAGATACCTGGCCTGGTCTGGACACAGTGCCCGTGTCCGGAGC

```

【0315】

【表 6 6】

CGCGCGAGATATGGCCCGCGCTGGAGTTTCAATACCGGAGATCATGCAAGCTGGTGGCTGGA
 CCAATGTAAATATTGTCATGAACATATCCGTAACCTGGATAGTGAAACAGGGGCAATGGTGC
 GCCTGCTGGAAGATGGCGATTAGGAGCTCGCATCACACGCAAAAAGGAAATTGGAATAAATGC
 GAAATTTGAGATGTTAATTAAGACCTTTTTGAGGTCTTTTTTCTTAGATTTTTGGGGTTATTTA
 GGGGAGAAAACATAGGGGGGTACTACGACCTCCCCCTAGGTGTCCATTGTCCATTGTCCAA
 ACAAATAAATAAATATTGGGTTTTAATGTTAAAAGGTTGTTTTTATGTTAAAGTGAAAAAACA
 GATGTTGGGAGGTACAGTGATAGTTGTAGATAGAAAAGAAGAGAAAAAAGTTGCTGTTACTTTA
 AGACTTACAACAGAGAAAATGAGATATTAAATAGAATCAAAGAAAAATATAATTAGCAAATC
 AGATGCAACCGGTATTCTAATAAAAAAATATGCAAAGGAGGAATACGGTGCATTTTAAACAAAA
 AAAGATAGACAGCACTGGCATGCTGCCTATCTATGACTAAATTTTGTTAAGTGATTAGCACCG
 TTATTATATCATGAGCGAAAATGTAATAAAAGAAACTGAAAACAAGAAAAATTCAAGAGGACGT
 AATTGGACATTTGTTTTATATCCAGAATCAGCAAAAGCCGAGTGGTTAGAGTATTTAAAAGAGT
 TACACATTCAATTTGTAGTGTCTCCATTACATGATAGGGATACTGATACAGAAGGTAGGATGAA
 AAAAGAGCATTATCATATTCTAGTGATGTATGAGGGTAATAAATCTTATGAACAGATAAAAAATA
 TTAACAGAAGAATTGAATGCGACTATTCGCGAGATTGCAGGAAGTGTGAAAGGTCTTGAGAA
 TATATGCTTCACATGGACGATCCTAATAAATTTAATATCAAAAAGAAGATATGATAGTTTATGG
 CGGTGTAGATGTTGATGAATTATTAAGAAAAACAACAACAGATAGATATAAATTAATTAAGAAA
 TGATTGAGTTTATTGATGAACAAGGAATCGTAGAATTTAAGAGTTTAATGGATTATGCAATGAAG
 TTTAAATTTGATGATTGGTTCCCGCTTTTATGTGATAACTCGGCGTATGTTATTCAAGAATATAT
 AAAATCAAATCGGTATAAATCTGACCGATAGATTTTGAATTTAGGTGTCACAAGACACTCTTTTT
 TCGCACCCAGCGAAAACCTGGTTAAGCCGACTGGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGAT
 GGTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCTCTGGATGTGCTCCACAAGGTAAACAGTTGAT
 TGAAGTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGCTCACAGTACGCGTAG
 TGCAACCGAACGCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGCACATCAGCGCCTGGCAGCAGTGGCG
 TCTGGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCCGCGTCCCACGCCATCCCGCATCTGACCA
 CCAGCGAAATGGATTTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAG
 GCTTTCTTTCACAGATGTGGATTGGCATAAAAAACAACCTGCTGACGCCGCTGCGCGATCAGT
 TCACCCGTGCACCGCTGGATAACGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATTGACCCTAAC
 GCCTGGGTGCAACGCTGGAAGGCGGCGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAGT
 GCACGGCAGATACACTTGCTGATGCGGTGCTGATTACGACCGCTCAGCGTGGCAGCATCAG
 GGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAACCTACCGGATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATT
 ACCGTTGATGTTGAAGTGGCGAGCGATACCCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGAACTGCCA
 GCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAACTGGCTCGGATTAGGGCCGCAAGAAAACCTATCCC
 GACCGCCTTACTGCCGCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTGAGACATGTATACCCCG
 TACGTCTTCCCGAGCGAAAACCGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAATTGAATTATGGCCACA
 CCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTACAGTCAACAGCAACTGATGGAAA
 CCAGCCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGACGGTTTCCAT
 ATGGGGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTCCAGCTGAGCG
 CCGGTGCTACCATACCAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAATAAACCAGGGCAGGCCATGTC
 TGCCCGTATTTGCGTAAGGAAATCCATTATGTACTATTTCAAGCTAATTCGGTGGAAACGAG
 GTCATCATTTCTTCCGAAAAACGGTTGCATTTAAATCTTACATATGTAATACTTTCAAAGACT
 ACATTTGTAAGATTTGATGTTTGAGTCGGCTGAAAGATCGTACGTACCAATTATTGTTTCGTGAT
 TGTTCAAGCCATAACACTGTAGGGATAGTGAAAGAGTGCTTCATCTGGTTACGATCAATCAAA
 TATTCAAACGGAGGGAGACGATTTTGATGAAACCACTAACGTTATACGATGTGCGAGAGTATG
 CCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGAACCAAGGCCAGCCAGCTTTCTGCGAAAA
 CGCGGGAAAAAGTGGAAGCGGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTTCCCAACCGCTGCGCACA
 CAACTGGCGGGCAACAGTCGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGC
 GCCGTGCAAAATTGTGCGGCGGATTAATCTGCGCGCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGG
 TGTGATGGTAGAACGAAGCGGCGTGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCG
 CAACGCGTCAGTGGGCTGATCATTAACATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAA
 GCTGCCTGCACTAATGTTCCGGCGTTATTTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAACAGTA
 TTATTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTGCATTGGGTCAAC
 AGCAAATCGCGCTGTTAGCGGGCCATTAAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGC
 TGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGT
 GCCATGTCCGGTTTTCAACAAACCATGCAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATG
 CTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGCTGC
 GCGTTGGTGCGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCC
 CGCGTCAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCTGCTGGGGCAAACCAAGCGTGGACCGCTTG

10

20

30

40

【表 6 7】

CTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAA
 AAGAAAAACCACTTGGCGCCCAATACGCAACCGCCTCTCCCGCGCGTGGCCGATTTCAT
 TAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAA
 TGTGAGTTAGGCATCGCATCCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACAC
 ATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCC
 GTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAG
 CGATAGCGGAGTGATACTGGCTTAACATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGTGAGAGTGAC
 CATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCC
 GCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCA
 CTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAG
 CAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTGTGCTGGCGTTTTTCCATAGG
 CTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGAC
 AGGACTATAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGAC
 CCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATG
 CTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACG
 AACCCCCCGTTACGCCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCG
 GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTA
 TGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGT
 ATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATC
 CGGCAAAACAAACCAACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAG
 AAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGA
 AAATCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAA
 ATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAA
 TGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTATCCATAGTTGCCTGAC
 TCCCGTCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATG
 ATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAG
 GGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCG
 GGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCAGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGG
 CATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCTAACGATCAAG
 GCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGT
 TGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTT
 ACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAG
 AATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCA
 CATAGCAGAAGTTTAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGG
 ATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCAACCAACTGATCTTCAGCAT
 CTTTTACTTTCACAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGG
 GAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATCTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATT
 TATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGG
 GGTTCGCGCGACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCCAATAGACCAGTTGCAATCCAAA
 CGAGAGTCTAATAGAATGAGGTCGAAAAGTAAATCGCGTAATAAGGTAATAGATTACATTAGA
 AAATGAAAGGGGATTTTATGCGTGAGAATGTTACAGTCTATCCCGGCATTGCCAGTCGGGGAT
 ATTAATAAGAGTATAGGTTTTTATTGCGATAAACTAGGTTTCACTTTGGTTACCATGAAGATGG
 ATTCGCAGTTCTAATGTGTAATGAGGTTTCGATTCTATGGGAGGCAAGTGATGAAGGCTG
 GCGCTCTCGTAGTAATGATTCACCGGTTTGTACAGGTGCGGAGTCGTTTATTGCTGGTACTGC
 TAGTTGCCGCATTGAAGTAGAGGGAATTGATGAATTATATCAACATATTAAGCCTTTGGGCATT
 TTGCACCCCAATACATCATTAAGATCAGTGGTGGGATGAACGAGACTTTGCAGTAATTGATC
 CCGACAACAATTTGATTACAAATAAAAAGCTAAATCTATTATTAATCTGTTCTGACAGGAGAGA
 CCG

10

20

30

40

【0317】

D. トランスクリプトームDNAアレイ法

上述の方法に加えて、トランスクリプトームDNAアレイ法を本発明の突然変異体の発
 生において用いた。最初に標的RNAを、当該技術分野に既知であるグアニジン酸フェノ
 ール抽出によりバチルス菌株より回収し（例えば、ファレル（Farrell）、『RNA
 方法論』（第2編）、アカデミック・プレス社、サンディエゴ、81頁を参照されたい
 ）、de Saizieu他（de Saizieu他、J. Bacteriol.、182
 巻、4696-4703頁〔2000年〕）から採用された方法および本発明で記述され
 た方法により時間ポイントをビオチン標識cDNAに逆転写した。総RNA（25mg）

50

を100 mLの反応において、一晚37℃で培養した。反応は、1×ギブコ社製ファーストストランド・バッファ(50 mM Tris-HCl、pH 8.3、75 mM KCl、3 mM MgCl₂)、10 mM DTT、40 mMランダム六量体、各0.3 mMのdCTP、dGTPおよびdTTP、0.12 mMのdATP、0.3 mMのビオチン-dATP(NEN)、2500 ユニットスーパースク립トII逆転写(ロシュ社製)。RNAを除去するために、前記反応を0.25 M NaOH溶液とし、65℃で30分間培養した。前記反応をHClを用いて中和し、核酸を2.5 M酢酸アンモニウムを含むエタノールにおいて-20℃で沈殿させた。ペレットを洗浄し、空気乾燥し、水中に再懸濁し、UV分光法により定量化した。反応収量は、約20~25 mg ビオチン標識cDNAであった。

10

【0318】

cDNAの12 mgを、37℃で10分間、3、75 ミリユニットのDNase I Iを含む33 mL 1×One-Phor-Allバッファ(アマーシャム-ファルマシア社製#27-0901-02)において断片化した。DNase Iを熱不活性化後に、3%アガロースゲル上で2 mgの断片化cDNAを泳動することにより断片化を評価した。ビオチン含有cDNAは、常に25~125ヌクレオチドの大きさに分布した。残りの10 mgのcDNAをアフィメトリクス社製バチルス・ジーン・チップ・アレイへハイブリダイズした。

【0319】

ハイブリダイゼーションを、示唆された試薬供給装置を用いてアフィメトリクス・エクスプレッション・アナリシス・テクニカル・マニュアル(アフィメトリクス社製)に記述の通り行なった。短時間に、10 mgの断片化ビオチン標識cDNAを220 mLのハイブリダイゼーション反応混液に添加した。ハイブリダイゼーション反応混液は、100 mMのMES(N-モルフォリンエサンネスフォン酸)、1 MのNa⁺、20 mMのEDTA、0.01%のTween 20、5 mg/mLの総イーストRNA、0.5 mg/mLのBSA、0.1 mg/mLのにしん精子DNA、50 pMのコントロールのオリゴヌクレオチド(AFFX-B1)である。反応混液を95℃で5分間加熱し、5分間で40℃で冷却し、微粒子を除去するために短時間遠心分離し、200 mLをそれぞれ予め暖め洗浄した(1×MESバッファ+5 mg/mL イーストRNA) ジーンチップカートリッジに注入した。アレイを40℃で一晩回転した。

20

30

【0320】

サンプルを除去し、アレイに非ストリンジェントな洗浄バッファ(6×SSPE、0.01% TWEEN(登録商標)-20)を充填し、非ストリンジェントおよびストリンジェントな(0.1 MのMES、0.1 M [Na⁺]、0.01% Tween 20)洗浄バッファを用いて、プロトコルEuk-GE-WS2によりアフィメトリクス・フルイディクス・ステーション上で洗浄した。アレイを3段階で染色した。すなわち(1)ストレプトアビジン、(2)ビオチンで標識された抗ストレプトアビジン抗体、(3)ストレプトアビジン-フィコエリトリン複合体、である。

【0321】

アレイにおけるシグナルを、3-mmピクセル分解能を有する570 nmレーザー光線を用いてヒューレット・パッカー・ダニエルズ遺伝子アレイ・スキャナーで検出した。4351 ORFプローブ・セットのシグナル強度を計り、時間経過実験を含む全時間ポイントにわたって規格化した。次に、これらのシグナルを、試験中の遺伝子の相対的発現レベルを推定するために比較した。スレオニン生合成遺伝子および分解性遺伝子を同時に転写し、非効率なスレオニン利用を示した。分解性スレオニン経路の欠失は、所望の生産物の発現を改善した(表7を参照されたい)。本発明は、スレオニンの生合成および分解性プロファイルと類似している転写プロファイルを用いて経路を修飾するための手段を提供する。従って、本発明はまた、バチルス菌株を最適化するためにスレオニンと類似する転写プロファイルを用いた経路の修飾を利用する。いくつかの好ましい態様において、rocA、ycgN、ycgM、rocFおよびrocDからなる群より選択される一つ以上の遺伝子は欠

40

50

失または修飾される。本発明において記述されるように本発明の利用は、s i g Dレギュロンが転写されるという驚くべき発見をもたらした。この遺伝子の欠失は、所望の生産物のよりよい発現をもたらす（表 7 を参照されたい）。

【0322】

これらの予備的な実験、ヒスチジン要求性宿主株における p c k A の欠失、「KH5」は、振とうフラスコ中の最小培地で増殖する菌株における改良または害悪をもたらさなかった。しかし、本発明は p c k A 欠失の利用または修飾、および／または g a p B および／または f b p の欠失または修飾との組み合わせを通じて菌株タンパク生産を改良する手段を提供する。更に、本発明の開発中に、トリプトファン生合成経路遺伝子が不均衡な転写を示すことが観察された。従って、本発明は、親（すなわち野生型および／または出発菌株）と比べて、改良された菌株が所望の生産物の改良された発現を提供するために、t r p A、t r p B、t r p C、t r p D、t r p E、および／または t r p F からなる群から選択されるもののよう、遺伝子の増大した転写を示す菌株を生産することに利用され则认为られる。実際、任意の組合せにおけるこれらの遺伝子の修飾は、所望の生産物の改良された発現を導くと考えられる。更に、追加的な実験（以下の実施例 6 に記述される）は、p c k A 遺伝子の不活性化は、欠失菌株において発達した、改良された炭素利用効率により増大したタンパク質発現を導くことを示した。

【0323】

E. 発酵

上述の構築体を用いて生産された菌株の分析により、以下の発酵が導かれた。14 L 規模の培養を B I O L A F I T T E（登録商標）発酵槽において行なった。7 リットル当たりの培地の構成成分を表 9 に掲載する。

【0324】

【表 68】

表 9. 7L 発酵ごとの媒地成分

NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	0.8%	56g
KH ₂ PO ₄	0.8%	56g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.28%	19.6g
抗発泡剤	0.1%	7g
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.01%	0.7g
硫酸第一鉄・7H ₂ O	0.03%	2.1g
MnCl ₂ -4H ₂ O	0.02%	1.4g
微量金属 100 x	1%	70g
ストック*		
H ₂ SO ₄	0.16%	11.2g
60%グルコース	1.29%	90

*上記「ハワードとカティング」549 頁を参照

【0325】

前記槽を 750 r p m で攪拌し、気流を分当たり 11 リットルに調節し、温度は 37 °C、および pH は N H₄ O H を用いて 6.8 に維持した。60 % グルコース溶液を、発酵の最後まで分当たり 0.5 ~ 2.1 グラムの線状ランプで約 14 時間から供給開始した。発生気体（o f f - g a s s e s）を質量分析法によりモニターした。炭素収支および効率を、供給グルコース、タンパク質生産物の収量、細胞質量収量、ブロスにおける他の炭素

、および発生CO₂より計算した。突然変異菌株を、改善を判断するために親菌株と比較した。実際、以下の実施例6に記述するように、いくつかの菌株におけるpckAの修飾は、関心あるタンパク質の増大した生産を導いた。いくつかの好ましい態様において、追加的な遺伝子を、gapB、alsD、および／またはfbp～なる群より選択する。

【0326】

実施例4

改変バチルス菌株を得るための宿主細胞の形質転換

一旦DNA構築体を、上述の方法1または2により作成し、それを適切なバチルス・ス
ブチルス実験室菌株に形質転換した（例えば、BG2036またはBG2097、任意の
コンピテントバチルス即時型宿主細胞を、本発明の方法において使用することが可能である）。細胞を適当に0.5ppmフレオマイシンまたは100ppmスペクチノマイシンの
選択培地においてプレートした（フェラーリおよびミラー、「バチルスの発現：グラム
陽性モデル」、『遺伝子発現システム：発現技術に関する自然の利用』所収、65-94
頁[1999年]）。実験室菌株を、バチルス・スブチルス生産宿主菌株2回またはBG
3594および次にMDT98-113、1回に形質転換する欠失を有する染色体DNA
源として使用した。単一コロニーを単離するために形質転換体をストリーク（streak）し、採取および5mLのLBプラス適当な抗菌剤において一晚増殖させた。染色体D
NAを、当該技術分野に知られているように単離を行なった（たとえばハードウッド他、
上記を参照されたい）。

【0327】

組込みDNA構築体の存在を、上述の成分および条件を用いた3つのPCR反応により
確認した。例えば、二つの反応は、あるケースにおいては、欠失カセットの外部から抗菌
遺伝子に（プライマー1および11）および他の場合には、挿入全体を通じて（プライマ
ー1および12）領域の増幅を設計した。第3の点検は欠失カセットの外部から欠失領域
に（プライマー1および4）領域を増幅した。図4は最初の二つの場合であり第3ではな
いバンドを示す適正クローンを示す。野生型バチルス・スブチルス染色体DNAを、全て
の反応における負のコントロールとして用い、第3のプライマーセットを用いたバンドの
み増幅した。

【0328】

実施例5

振とうフラスコ・アッセイ・プロテアーゼ活性の測定

一旦DNA構築体をコンピテント・バチルス・スブチルス菌株に安定的に組み込むと、
スブチリシン活性を振とうフラスコ・アッセイにより測定し、活性を野生型レベルと比較
した。アッセイは、当該技術分野に既知のスブチリシン生産に好適な50mLの増殖培地
を含む250mLのバッフル・フラスコにおいて行なった（クリスチャンソン（Chri
stianson）他、Anal. Biochem.、223巻、119-129頁[1
994年]、およびシャ（Hsia）他、Anal. Biochem.、242巻、22
1-227頁[1996年]を参照されたい）。培地に50μLの8時間8mLの培養物
を播種し、37℃で40時間、250rpmで振とうして増殖させた。次に、プロテアー
ゼ活性アッセイのために1mLのサンプルを17、24および40時間目で採取した。プ
ロテアーゼ活性を、モナーク・オートマチック・アナライザーを用いて405nmで測定
した。サンプルを2回バッファーにおいて、1:11（3.131g/L）に希釈した。
正しい機械のキャリブレーションを保障するコントロールとして、一つのサンプルを1:
6（5.585g/L）、1:12（2.793g/L）および1:18（1.862g
/L）に希釈した。図7は、種々の改変バチルス・スブチルスクローンに於けるプロテア
ーゼ活性を示す。図8は、バチルス・スブチルス野生型菌株（未改変）および対応する改
変欠失菌株（-sbo）および（-slr）における振とうフラスコの培養液から測定し
た改善したプロテアーゼ分泌を表すグラフを示す。プロテアーゼ活性（g/L）を17、
24および40時間後に測定した。

【0329】

また、細胞密度を600のODで分光光度測定を用いて測定した。計測時間において、サンプルに関して有意差は観察されなかった（データは示していない）。

【0330】

実施例6

pckA欠失構築体

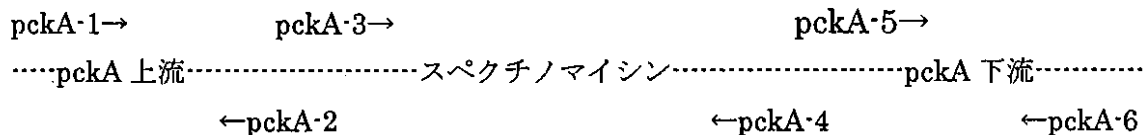
この実施例において、本発明のpckA欠失突然変異体が追加的に記述される。実施例2Bに示したように、pckA欠失構築体を、大腸菌使用の要件を回避するためにPCR融合法を用いた実施例2Bにおける記述のように生産をした。この実施例において、実施例に従って生産した欠失突然変異体を修飾した。前記PCRプライマーであるpckA-1、pckA-2、pckA-3、pckA-4、pckA-5、およびpckA-6（表5を参照されたい）を、鑄型としてバチルス・スブチルスBG2816および168pDG1726（Guerrout-Fleury他、遺伝子、167巻、（1-2）335-336頁[1995年]を参照されたい）の染色体DNAを用いたPCRおよびPCR融合反応に使用した。これらの欠失突然変異体の構築において使用した方法は、上述の方法1と同じである。

【0331】

PCR融合を、pckA上流-spec-pckA下流のDNAカセットを生成した3つの異なったDNA上で、上述のように行なった（1.998kb）。PCR融合のストラテジーは、以下の通りである。

【式1】

【0332】



【0333】

結果によると、1.988kb PCRを融合断片を示す予期された単一断片が、正確に組立てられた。このカセットは、次に、「pKH5」（4.9kb）を生成するために、PCR-script SK+にサブクローニングした。pKH5の構築をPCRおよびHindIII制限消化パターン結果により確認した。次にpKH5を、Scalにより消化し、KH5およびKHB5を構築するために、BG2816（ΔnprE、ΔaprE、his）およびプロテアーゼ生産B・スブチルス菌株（「FNAハイパー1」：ΔaprE：：スブチリシン-Cm、ΔnprE、degUHy32、oppA、ΔspolIE350と命名されたコントロール菌株）の形質転換に用いた。形質転換された細胞を、100ug/ml スペクチノマイシンを含むLAプレート上に置き、37℃で一晩培養した。形質転換体を抗生物質抵抗により組込むために選択し、更にPCRにより分析した。分析されたKH5の全形質転換体をダブル・クロスオーバー組込みとして同定した。KH5の染色体DNAを単離し、KHB5を構築するためにFNAハイパー1を形質転換するために用いた。

【0334】

KH5の遺伝子型は、BG2816、ΔpckA：：specであり、KHB5の遺伝子型はFNAハイパー1、ΔpckA：：specであった。pckA欠失菌株およびコントロールpckA野生型菌株を比較するために、いくつかの実験をpckA欠失菌株の特徴づけのために行なった。図9は、LA+1.6%スキムミルク培地上のpckA欠失菌株およびコントロール菌株により生成されたすき通った「ハロ」を示す写真を示す。この図に示されるように、前記pckA欠失菌株（KHB5）は、コントロール菌株（FN 50

A ハイパー 1) よりもわずかに大きなハロを生成した。

【0335】

図10のパネルAは、親菌株(FNAハイパー1)および実施例3のEに記述したような最小培地において増殖したpckA欠失菌株の光学密度を示すグラフを示す。このグラフによって示されるように、pckA欠失菌株は、親菌株よりも短い期間でより多く増殖した。図10のパネルBは、親菌株および時間を通じてg/リットルで表された複合培地に基づくソイミールーグルコースにおいて増殖したpckA欠失菌株の力値を示すグラフを示す。図10のパネルCは、親菌株および複合培地に基づくソイミールーグルコースにおいて増殖したpckA欠失菌株の炭素収量を示すグラフを示す。このパネルに示されるように、前記pckA欠失菌株は、炭素のグラムベースで生産されたプロテアーゼ量に基づく炭素利用においてより効率的であった。 10

【0336】

この炭素収量を以下の数式に基づいて計算した。

【数1】

$$Y_{\text{生成物}, C}(t) [\%] = \frac{m_{\text{プロセス}}(t) [\text{kg}] \cdot \frac{1}{\rho} \left[\frac{1}{\text{kg}} \right] \cdot \text{Activity}(t) \left[\frac{\text{g 活性}}{1} \right] \cdot X \left[\frac{\text{g プロテイン}}{\text{g 活性}} \right] \cdot Y \left[\frac{\text{g C}}{\text{g プロテイン}} \right]}{m_{C, \text{原料固体}}(t) [\text{g C}] + m_{C, \text{soy}}(t) [\text{g C}]}$$

X = 本発明で用いられる式“g タンパク質/g 活性”においてタンパク量/活性単位 20

Y = 分子中の炭素質量%

指標“(t)”は特異時間点における意味である。

ρ = 密度

【0337】

pckA欠失突然変異菌株は、複合培地に存在する炭素を利用することでより効率的であった(バイオマスになる炭素において少なくとも10%の増大を示すことによって示唆されているように)にも拘わらず、プロテアーゼ生産はこの培地において影響されなかった(細胞当たりベースにおいて)。しかし、最小培地において、突然変異pckA欠失菌株は、コントロール菌株と比較してより多くのプロテアーゼおよび細胞を生産することが可能であることが分かった。本発明においてより詳細に議論されたように、LA+1.6%スキムミルクプレート上で、pckA欠失菌株であるKHB5はコントロール親菌株(FNAハイパー1)よりも大きいハロを形成することができた(すなわち、親よりも突然変異によってより多くのプロテアーゼが生産された)。更に、pckA欠失菌株であるKHB5は、最小培地(すなわち、唯一の炭素源としてグルコースを用いて)において、コントロール親菌株(FNAハイパー1)よりも高い光学密度に達する事ができた。これらの結果は、同じ炭素量から、pckA突然変異菌株が親菌株よりも多くの細胞を生産することを示す。 40

【0338】

上記明細書において言及した全ての出版物および特許は、参照により本発明に組み込まれる。発明の前記の方法およびシステムの種々の修飾が、本発明の範囲と精神から逸脱しないことは、当業者にとって明らかである。本発明が特定の好ましい態様に関連して記述されたにもかかわらず、本発明はそのような特定の態様に過度に限定するべきでないことを理解すべきである。実際に、発明を実施するための前記の様式の種々の修飾は、本発明の範囲において目的とされる技術および/または関連した分野の当業者にとって明白である。

【図面の簡単な説明】

【0339】

【図 1】 本発明によって提供される 1 つの方法（実施例 1）の一般的な概念図を示す図である。

【図 2】 本発明によって提供される 1 つの方法（実施例 1）の一般的な概念図を示す図である。

【図 3】 本発明のいくつかの態様に従った DNA カセットの作成において使用されるプライマーの位置を示す図である。

【図 4】 本発明の一つの方法（実施例 2）の一般的な概念図を示す図である。

【図 5】 バチルス D H B 欠失クローンの電気泳動ゲルを示す図である。

【図 6】 バチルス・スプチルス（野生型）の生産菌株の二つのクローンのゲル電気泳動を示す図である。

【図 7】 バチルス・スプチルス（野生型）の生産菌株のクローンの電気泳動ゲルを示す図である。

【図 8】 バチルス・スプチルス野生型菌株（未改変）および対応する種々の欠失を有する改変バチルス・スプチルス菌株を用いた振動フラスコの培養液から測定された、改善されたスプチリシン分泌を示す棒グラフを示す図である。

【図 9】 バチルス・スプチルス野生型菌株（未改変）および対応する改変欠失菌株（-s b o）および（-s l r）の振動フラスコの培養液から測定された、改善されたプロテアーゼ分泌を示す棒グラフを示す図である。

【図 10】 制御菌株および p c k A 欠失菌株によって作られた円光写真を示す図である。

【図 11】 時間を通じて（「E F T」は発酵経過時間のことを言う）最小培地で培養された親菌株および p c k A 菌株の光学濃度を示すグラフを示す図である。

【図 12】 時間を通じてグラム／リッターで表示された富栄養培地で培養された親菌株および p c k A 欠失菌株の力価を示すグラフを示す図である。

【図 13】 富栄養培地で培養された親菌株および p c k A 欠失菌株の炭素生産を示すグラフを示す図である。

【図 1】

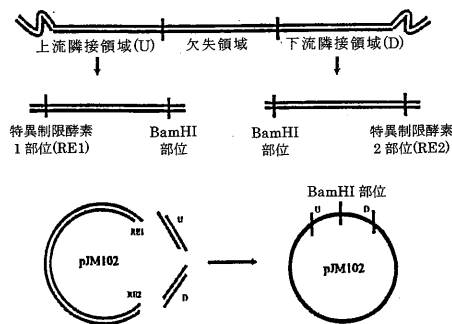


図 1A

【図 2】

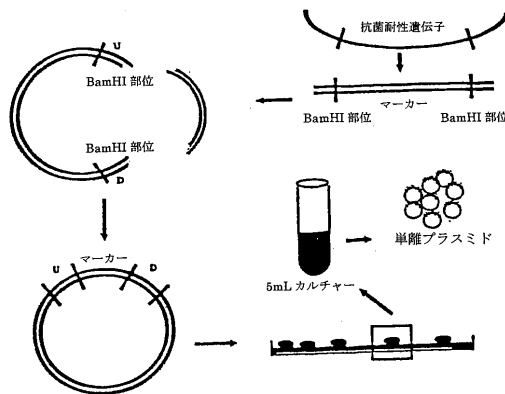


図 1B

【図 3】

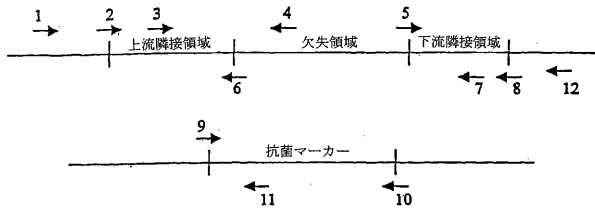


図 2

【図 4】

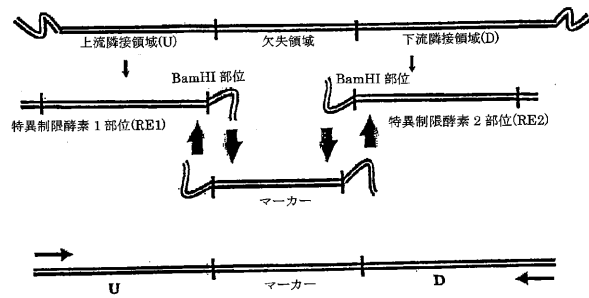


図 3

【図 6】

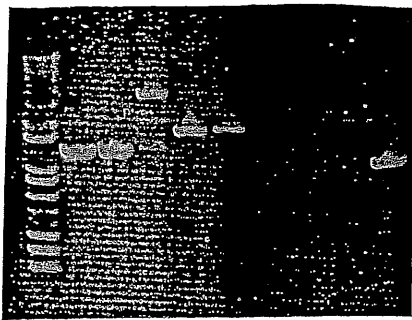


図 5

【図 5】

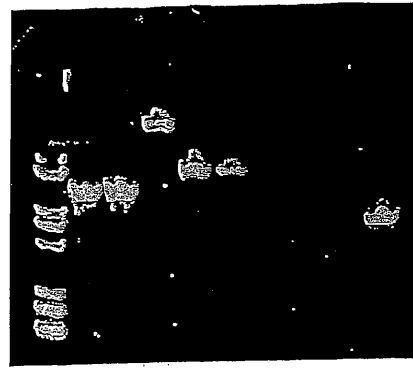


図 4

【図 7】

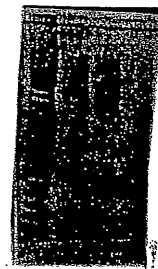
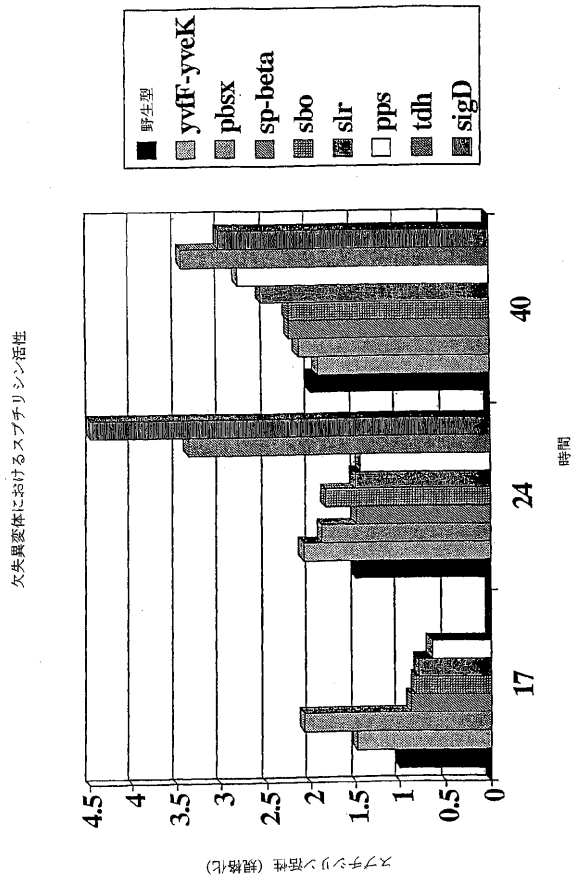
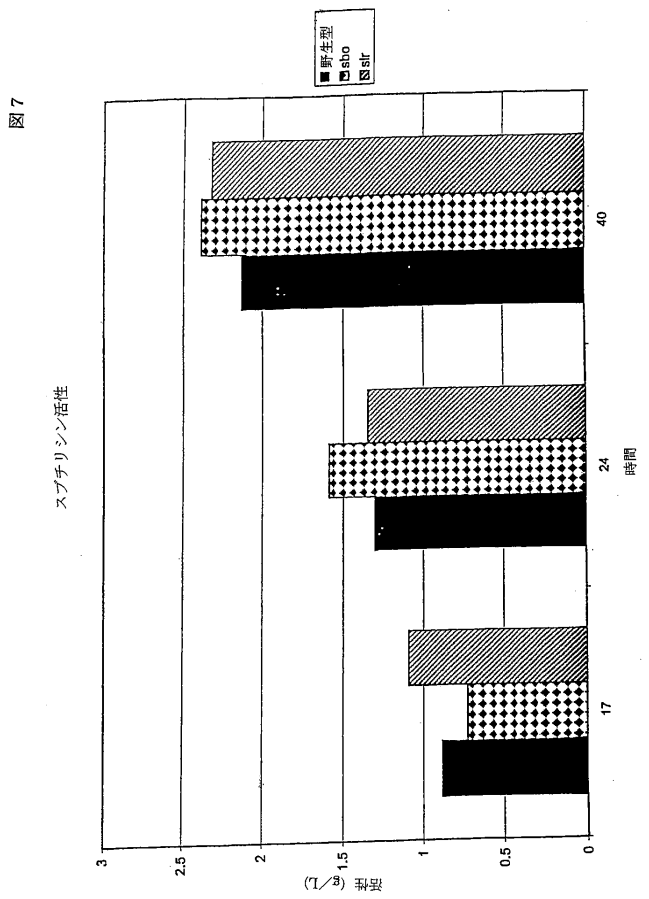


図 6

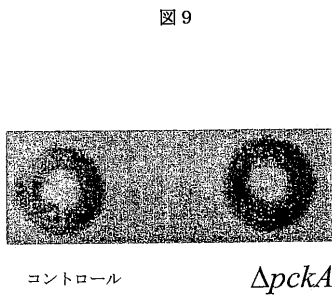
【図 8】



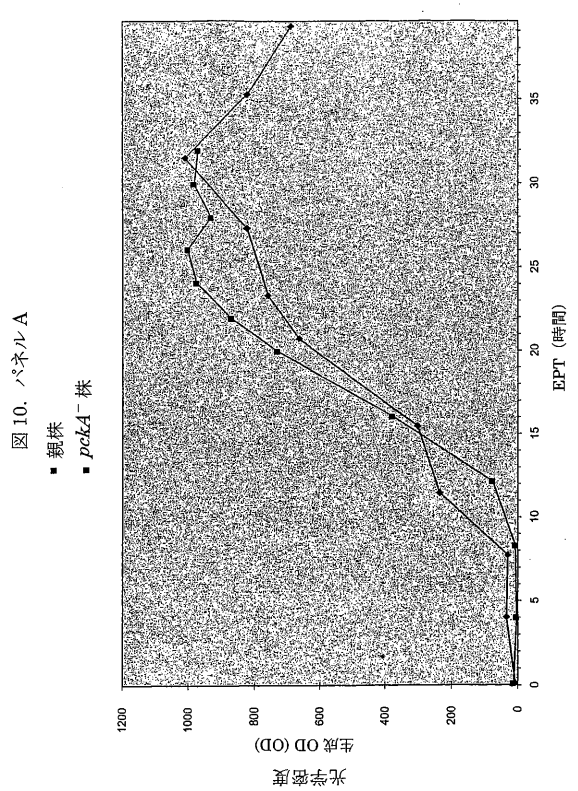
【図 9】



【図 10】

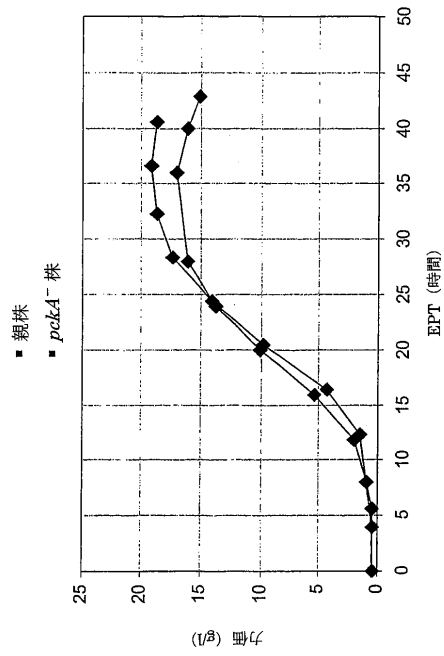


【図 11】



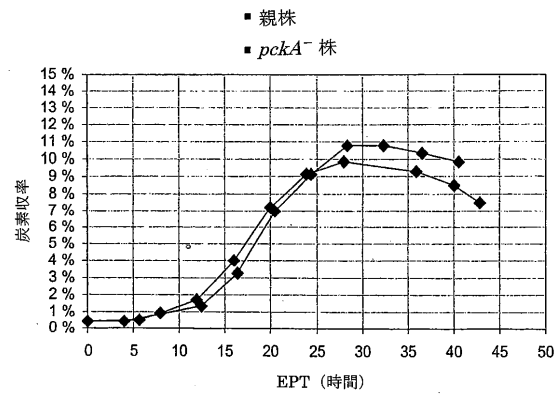
【図 1 2】

図 10. パネル B



【図 1 3】

図 10. パネル C



【国際調査報告】

60700160019



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
PCT/US2005/011821

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/32 C12N15/63 C12N9/88 ADD. C12R1/125		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K C12R C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, Sequence Search, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/083125 A (GENENCOR INTERNATIONAL, INC; FERRARI, EUGENIO; HARBISON, CAROLE; RASHI) 9 October 2003 (2003-10-09) the whole document, in particular p. 86, 1.1-15 and claims	1-27, 38-44, 55-64
X	US 2002/065403 A1 (EIKMANN'S BERNHARD ET AL) 30 May 2002 (2002-05-30) the whole document, in particular Example 5	1-4
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 August 2006		Date of mailing of the international search report 01.12.2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bassias, Ioannis

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

16.3.2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/011821**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-27, 38-44, 55-64

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2005 /011821

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: Claims: 1-27,38-44,55-64

Microorganisms (in particular Bacillus) comprising a modified pckA gene, methods for enhancing production of a protein by inactivating the pckA gene and methods for obtaining Bacillus subtilis strains having enhanced protease production wherein pckA is deleted in the chromosome of said strains.

Inventions 2-28: claims: 28-37 (all partially)

Isolated nucleic acids (SEQ ID NOs:1,3,5,7,9,11,13,15,39,40,42,44,46,48,50,37,25,21,50,23,27,19,31,48,46,35,33, corresponding sequences of encoded polypeptides SEQ ID NOs:2,4,6,etc.) and host cells transformed with said nucleic acids.

Invention 29: Claims 45-54

Methods for obtaining an altered Bacillus strain expressing a protein of interest, wherein said Bacillus host cell comprises the pckA gene and has furthermore one or more chromosomal genes inactivated.

Invention 30: Claims: 65-74

Methods for enhancing the expression of a protein of interest in Bacillus, wherein said Bacillus host strain comprises a deletion of an indigenous chromosomal region.

Invention 31: Claims 75-81

Methods of enhancing the expression of a protein of interest in Bacillus wherein the nucleic acid for the protein of interest is obtained by transcriptome DNA array analysis.

Invention 32: Claims 82-85

Methods for enhancing the expression of a protein of interest in Bacillus wherein an altered Bacillus strain is used which comprises a modified gene selected from the group consisting of prpC, sigD and tdh/kbl.

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/011821

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RIEDEL C ET AL: "CHARACTERIZATION OF THE PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE GENE FROM CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM AND SIGNIFICANCE OF THE ENZYME FOR GROWTH AND AMINO ACID PRODUCTION" JOURNAL OF MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, HORIZON SCIENTIFIC PRESS, WYMONDHAM,, GB, vol. 3, no. 4, 2001, pages 573-583, XP001031161 ISSN: 1464-1801 the whole document, in particular Table 1 and paragraph bridging p.578/579	1-4
X	EP 0 723 011 B (AJINOMOTO CO., INC) 3 July 2002 (2002-07-03) the whole document, in particular the claims	1-3
P,X	US 2004/241831 A1 (PARK YOUNG HOON ET AL) 2 December 2004 (2004-12-02) the whole document, in particular paragraph [0012]	1-3
A	WO 03/070963 A (GENENCOR INTERNATIONAL, INC; BRON, SIERD; FERRARI, EUGENIO; TJALSMA, H) 28 August 2003 (2003-08-28)	

51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/011821

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03083125 A	09-10-2003	AU 2003228393 A1 CA 2480277 A1 EP 1495128 A1 JP 2005521407 T	13-10-2003 09-10-2003 12-01-2005 21-07-2005
US 2002065403 A1	30-05-2002	AT 338133 T AU 6410400 A BR 0004957 A CA 2322555 A1 CN 1308125 A DE 19950409 A1 EP 1094111 A2 HU 0004115 A2 ID 27693 A JP 2001149086 A MX PA00009958 A PL 343339 A1 SK 15292000 A3 ZA 200005843 A	15-09-2006 26-04-2001 29-05-2001 20-04-2001 15-08-2001 26-04-2001 25-04-2001 28-09-2002 26-04-2001 05-06-2001 28-04-2005 23-04-2001 03-12-2001 17-05-2001
EP 0723011 B	03-07-2002	AT 220099 T AU 682547 B2 AU 8099194 A BR 9407625 A CA 2169170 A1 CN 1133615 A CZ 9600524 A3 DE 69430919 D1 DE 69430919 T2 EP 0723011 A1 HU 73690 A2 WO 9506114 A1 PL 313119 A1 SK 20496 A3 US 5876983 A US 5919694 A	15-07-2002 09-10-1997 21-03-1995 21-01-1997 02-03-1995 16-10-1996 12-06-1996 08-08-2002 27-02-2003 24-07-1996 30-09-1996 02-03-1995 10-06-1996 06-11-1996 02-03-1999 06-07-1999
US 2004241831 A1	02-12-2004	AU 2004225550 A1 BR P10409192 A CN 1768132 A EP 1611232 A1 JP 2006521789 T WO 2004087895 A1 MX PA05010725 A	14-10-2004 11-04-2006 03-05-2006 04-01-2006 28-09-2006 14-10-2004 15-12-2005
WO 03070963 A	28-08-2003	AU 2003208922 A1 EP 1472347 A2	09-09-2003 03-11-2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 Q 1/68

A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100120145

弁理士 田坂 一朗

(74)代理人 100138438

弁理士 尾首 亘聰

(72)発明者 ウェイレル、ウォルター

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 1 1 2、サン・フランシスコ、テレサ・ストリート 2
5 2

(72)発明者 スウ、エイミー、クアノーホア

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 0 6 5、レッドウッド・シティー、キールソン・サークル 5 2 8

F ターム(参考) 4B024 AA03 AA05 BA14 CA04 CA09 CA20 DA07 EA04 GA19 HA14

4B050 CC03 DD02 LL02

4B063 QA01 QQ06 QQ53 QS25 QS34 QX02

4B065 AA19X AA19Y AC14 BA02 BB03 BB15 BC02 BC03 BC05 BC26

CA33 CA41